

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



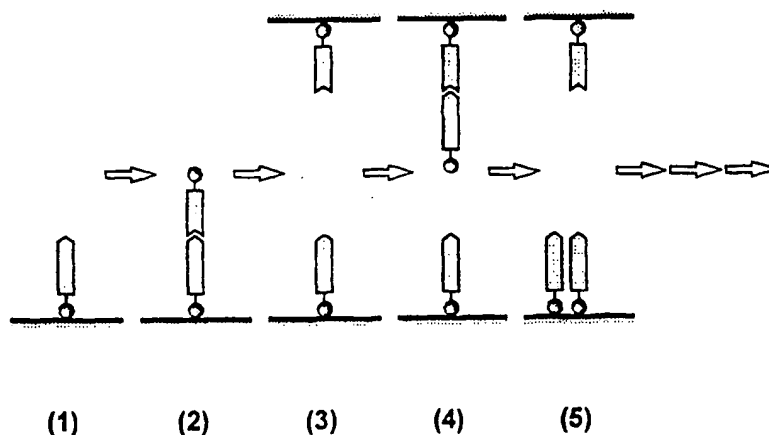
(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12Q 1/68		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/32809 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Juni 2000 (08.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03856 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. November 1999 (26.11.99) (30) Prioritätsdaten: 198 54 946.6 27. November 1998 (27.11.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): NOXXON PHARMA AG [DE/DE]; Gustav-Meyer-Allee 25, D-13355 Berlin (DE). (71)(72) Anmelder und Erfinder: VON KIEDROWSKI, Günter [DE/DE]; Steilstrasse 6c, D-44797 Bochum (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FÜRSTE, Jens, Pe- ter [DE/DE]; Huberweg 14, D-13559 Berlin (DE). KLUSSMANN, Sven [DE/DE]; Paulsbormer Strasse 83 A, D-10709 Berlin (DE). KLEIN, Thomas [DE/DE]; Philipp-Franck-Weg 9, D-14109 Berlin (DE). (74) Anwalt: BOECKH, Tobias; Vinck & Hertin, Umlandstrasse 173/174, D-10719 Berlin (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>

(54) Title: CLONING AND COPYING ON SURFACES

(54) Bezeichnung: KOPIEREN UND KLONIEREN AN OBERFLÄCHEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for cloning and copying genetic material on surfaces as well as copying biological material insofar as it, in a broader sense, can be classified in a ligand receptor system. The invention thus relates, in particular, to a method for propagating ligands and receptors on at least two surfaces which comprises one or several of the following cycles: a) Immobilizing a ligand on a first surface of a solid phase; b) adding a solution of receptors and binding complementary receptors to the ligands; c) transferring the receptor to an additional surface and immobilizing the receptor at that location; d) attaching an additional ligand to the immobilized receptor; e) transferring the ligand to a surface and immobilizing the same at that location. Nucleic acids are also understood as a ligand/receptor system.



(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Klonieren und zum Kopieren genetischen Materials an Oberflächen, aber auch das Kopieren von biologischem Material, soweit es sich in ein Ligand-Rezeptor-System im weiteren Sinne einordnen lässt. Die Erfindung betrifft daher insbesondere ein Verfahren zur Vermehrung von Liganden und Rezeptoren auf wenigstens zwei Oberflächen, umfassend einen oder mehrere der folgenden Zyklen: a) Immobilisierung eines Liganden an einer ersten Oberfläche einer Festphase; b) Zugabe einer Lösung von Rezeptoren und Binden komplementärer Rezeptoren an den Liganden; c) Übertragung des Rezeptors an eine weitere Oberfläche und dortige Immobilisierung des Rezeptors; d) Anlagerung eines weiteren Liganden an den immobilisierten Rezeptor; e) Übertragung des Liganden an eine Oberfläche und dortige Immobilisierung des Liganden. Als Liganden-/Rezeptor-System werden auch Nukleinsäuren verstanden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Klonieren und Kopieren an Oberflächen

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Klonieren und zum Kopieren genetischen Materials an Oberflächen, aber auch das Kopieren von biologischem Material, soweit es sich in ein Ligand-Rezeptor-System im weiteren Sinne einordnen lässt.

- 5 Verfahren zur exponentiellen Amplifikation molekularer Matrizen sind beispielsweise durch G. von Kiedrowski et al. (Nature 1998, Vol. 346, 245-248; DE 198 48 403) bekannt. Die Amplifikationszyklen sind dabei gekennzeichnet durch
- a) Binden von molekularen Matrizen an die Oberfläche einer Festphase mittels eines reversiblen Linkers an der Matrize;
 - 10 b) Zugabe von Matrizenfragmenten, wobei eines der Fragmente eine gegebenenfalls geschützte Linkereinheit aufweist;
 - c) Synthese von Kopien der Matrize;
 - d) Entfernen von überschüssigen Matrizenfragmenten und Reaktionshilfsstoffen;
 - 15 e) Ablösen der Kopien von der Matrize; und
 - f) Besiedlung freier Bindungsstellen an der Festphase durch synthetisierte Matrizenkopien.

Dieses Verfahren stellt somit ein iteratives schrittweises Amplifikationsverfahren dar, das es erlaubt, die vorhandene Menge an molekularer Matrize exponentiell zu erhöhen und somit einen sinnvollen Evolutionsprozeß ermöglicht. Das Verfahren verwendet dazu die Oberfläche eines festen Trägers. Durch chemische Verknüpfung auf immobilisierten Matrizen werden Kopien aus Vorstufenmatrizen syntheti-

20

siert, die dann freigesetzt werden, so dass sie zu neuen Matrizen werden. Der Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden.

Weiter ist aus der US 5,641,658 die sogenannte "Bridge"-Technologie bekannt. Hierbei handelt es sich um ein Amplifikationsschema, welches von konventionellen
5 PCR-Methoden ausgeht, sich jedoch zur Aufgabe gesetzt hat, ortsgebundene Amplifikation zu erreichen. Die "Bridge"-Technologie findet vielerlei Verwendung, insbesondere bei analytischen Methoden, die auch mit gewöhnlicher PCR durchgeführt werden könnten, jedoch Separations- und Detektionsschritte der amplifizierten Produkte erleichtert. Diese Technologie zeichnet sich dadurch aus, daß Amplifikation,
10 on, Selektion und Detektion in einem einzigen Verfahren vereint sind. Weitergehender Stand der Technik ist auf der Homepage der die "Bridge"-Technologie vermarktenden Firma MOSAIC Technologies, Inc. (USA) enthalten (www.mostek.com). Im wesentlichen handelt es sich bei dieser Technologie um folgendes:

Die Bridge-Technologie beschreibt ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren an Festphasen, wobei beide Amplifikationsprimer kovalent über ihr 5'-Ende an einer einzelnen Festphase gebunden sind. Es handelt sich daher um eine Weiterentwicklung der bekannten Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction", kurz: PCR). Statt in Lösung wird an einer festen Phase PCR durchgeführt. Besonderer Vorteil dieses Verfahrens ist die Fähigkeit, von einer einzelnen Probe eine
15 Vielzahl von verschiedenen genetischen Elementen simultan zu amplifizieren und zu analysieren. Anwendungsgebiete der Bridge-Technologie sind Genexpression, Genomforschung, klinische Diagnostik und Untersuchungen biologischer Flüssigkeiten, wie z.B. Blut. Eine erhöhte Amplifizierungsrate wird durch Eliminierung ineffektiver Primer-Artefakte (wie Primer-Dimere) erreicht. Dadurch
20 können einfache, sensitive und kostengünstige DNA-Detektionsmethoden entwickelt werden, z.B. mittels Fluoreszenz. Da die Bridge-Technologie vorsieht, daß sämtliche Amplifikationsprodukte an der festen Phase gebunden bleiben, sind Prolongationsverschmutzungen gering, was wiederum den diagnostischen Wert des Verfahrens im Gegensatz zur herkömmlichen PCR erhöht.

30 Während das oben beschriebene Verfahren von v. Kiedrowski et al. den Vorteil der Festphasenamplifizierung ganzer Populationen aufweist, weist das Verfahren ge-

- maß der US 5,641,658 den Vorteil auf, eine einzige Matrize an einer Festphase zu amplifizieren. Nachteilig an diesem Bridge-Verfahren ist, daß eine Amplifizierung mit dem Problem der Produktinhibition verbunden ist, d.h. eine neu hergestellte Kopie kann nicht nur mit dem benachbarten immobilisierten Primer, sondern auch mit dem ebenfalls benachbarten, ursprünglichen Matrizenstrang erfolgen. Weiterer Nachteil ist die untere Längenbegrenzung, die notwendig ist um die Brücke ("Bridging") als Doppelstrang zu erreichen. Ferner erfolgt keine Strangtrennung, so daß für den diagnostischen Einsatz die Hybridisierungssignale durch die Hybridisierung mit den komplementären Strängen abgeschwächt wird.
- 10 In der DE 694 09 646 T2 wird ein Verfahren zur Amplifikation einer Nukleinsäure beschrieben, bei dem der eine Primer an einer Festphase gebunden ist, und der zweite Primer an ein Teilchen gebunden ist, das auf ein magnetisches Feld anspricht. Diese Primer werden in Ziel-Nukleinsäuresequenzen eingebaut. Nach einem Extensionsschritt erfolgt eine Trennung der Nukleinsäurestränge durch Anlegen eines elektromagnetischen Feldes. Der magnetische Primer kann teilchengebunden, somit als eine Art von Festphase vorliegen. Zur Bindung der Primer an den Festphasen ist das Avidin/Biotin-System geeignet. Das Verfahren ist auch zur Klonierung geeignet.
- 15 In der US 5,795,714 ist ein Verfahren beschrieben, welches in einer Ausführung ein Array von Oligonukleotiden verwendet, die über Biotin-Avidin-Wechselwirkungen mit der Festphasen-Oberfläche verknüpft sind. Das Verfahren beschreibt in dieser Ausführungsform die Anhybridisierung komplementärer Stränge, Primerextensionsreaktionen, das Anhybridisieren eines zweiten biotinylierten Primers an die Primerextensionsprodukte und die Extension des zweiten Primers. Ein blotting der Kopien auf ein zweite mit Avidin beschichtete Oberfläche wird erwähnt. Als nächstliegender Stand der Technik wird daher die US 5,795,714 angesehen.
- 20
- 25
- 30 Nachteilig bei den genannten Verfahren ist, dass eine mehrfache Replikation im Sinne einer exponentiellen Amplifikation nicht möglich ist und dass die durch ein elektromagnetisches Feld erreichbare Translokation der Kopien nicht unter Erhalt der Ortsinformation erfolgt.

Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es daher unter Vermeidung der erwähnten Nachteile Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Klonierung und Kopierung an Oberflächen zur Verfügung zu stellen, welches die Vermehrung von biologischem Material unter Erhalt der Ortsinformation ermöglicht.

- 5 Überraschenderweise wurde ein Verfahren gefunden, welches es erlaubt, Nukleinsäuren, Liganden und Rezeptoren, sowie vergleichbare biologische Systeme zu vermehren und mit Hilfe eines elektrischen Feldes räumlich voneinander zu trennen, sowie auf einer oder mehreren festen Oberflächen nach der Vermehrung unter Erhalt der Ortsinformation zu immobilisieren und damit zu fixieren.
- 10 Im Sinne der Erfindung wird unter einem biologischen System grundsätzlich eine Wechselwirkung von Nukleinsäuren jedweder Art untereinander und/oder mit Peptiden/Proteinen/Polymerasen/Enzymen verstanden (DNA/RNA/PNA/pRNA/2' – 5' Nukleotide und RNA/DNA-Spiegelmerere (vgl. PCT/EP97/04726)), genauso wie Antigen/Antikörper-Komplexe oder generell Ligand/Rezeptor-Systeme.
- 15 Die Erfindung macht sich daher die Tatsache zunutze, dass Nukleinsäuren und zahlreiche andere biologisch relevante Moleküle aufgrund ihrer Ladung durch Anlegen eines elektrischen Feldes in diesem bewegt werden können. Vorliegend werden auf diese Weise ein jeweils stationär gebundenes Molekül von einem korrespondierendem Molekül getrennt, indem das nicht-stationär gebundene Molekül ent-
- 20 weder nach Synthetisierung desselben oder nach einer "Identifizierungsreaktion" mit Hilfe des elektrischen Feldes voneinander getrennt werden. Da die Moleküle entlang der Feldlinie des elektrischen Feldes wandern, führt dies zu einer Wanderung der Moleküle unter Erhalt der Ortsinformation. Dies unterscheidet das erfindungsgemäße Verfahren auch wesentlich von vorbekanntem Stand der Technik, da
- 25 beispielsweise in der DE 694 09 646 T2 die Ortsinformation nicht erhalten bleibt; denn das dort beschriebene elektromagnetische Feld dient nicht der Erhalt der Ortsinformation.

Vorzugsweise (aber nicht zwingend) sind die Oberflächen dabei koplanar zueinander angeordnet.

Zum grundsätzlichen Verständnis der Erfindung gehört, dass komplementäre Nukleinsäuren selbst nichts anderes als ein Spezialfall eines komplementären Ligand/Rezeptor-Systems im klassischen Sinn darstellen.

5 Die Erfindung betrifft daher ganz allgemein Verfahren zur Vermehrung von Liganden und Rezeptoren auf wenigstens zwei Oberflächen vor, umfassend einen oder mehrere der folgenden Zyklen:

- a) Immobilisierung eines Liganden an einer ersten Oberfläche einer Festphase;
- 10 b) Zugabe einer Lösung von Rezeptoren und Binden komplementärer Rezeptoren an den Liganden;
- c) Übertragung des Rezeptors an eine weitere Oberfläche und dortige Immobilisierung des Rezeptors;
- d) Anlagerung eines weiteren Liganden an den immobilisierten Rezeptor;
- 15 e) Übertragung des Liganden an eine Oberfläche und dortige Immobilisierung des Liganden.

Die Rolle der Oberfläche (nachfolgend auch "Träger") im erfindungsgemäßen Verfahren besteht darin, komplementäre Matrizen, die in Lösung stabile Duplexe bilden würden, voneinander getrennt zu halten. Geeignete Trägermaterialien bestehen
20 dabei aus organischem oder anorganischem Material oder aus einem Hybrid dieser Materialien. Organische Trägermaterialien sind Polymere auf Zuckerbasis, vorzugsweise Agarose, Cellulose, sowie geeignete Derivate oder technische Polymere wie Polystyrol, Polyacrylat, Polyacrylnitril, Polyalkene oder Pfropfcopolymer (z.B. PS PEG, PAN-PEG, PAN-PAG usw.), aber auch elektrisch leitende Polymere (z.B. Polyvinylpyrrol). Anorganische Trägermaterialien können z.B. Glas sowie Metalle sein,
25 wobei insbesondere der Goldoberfläche (infolge Goldthiolatwechselwirkung) und Halbleiteroberflächen besondere Bedeutung zukommt.

Bindungen können mittels kovalenter oder nicht-kovalenter Bindung erfolgen, wobei unter nicht-kovalenter Bindung sowohl ionische als auch nicht-ionische Bindungssysteme und insbesondere Mitglieder von immunologischen Bindungspaaren wie
30

Avidin/Streptavidin oder Antigen-Antikörper umfasst sind. Die Auswahl geeigneter Bindungslinker erfolgt unter dem Gesichtspunkt, dass diese nicht mit übrigen im System auftretenden Faktoren unerwünschte Wechselwirkungen eingehen. Insbesondere dürfen bei der Anhybridisierung eines Primers keine Wechselwirkungen mit Oberflächenbezirken auftreten, die das Templat enthalten. Dies setzt eine steuerbare und durch äußere Bedingungen beeinflussbare Bindungschemie voraus. Die Fehlimmobilisierung kann auch dadurch verhindert werden, dass an Stelle eines "aktivierbaren Reaktivprimers" (siehe unten) Paare von Primern verwendet werden, deren Extensionsprodukte orthogonal immobilisiert werden können. Orthogonal heißt hier, daß für einen Primer, der an ein Templat hybridisiert wird, keine Bindungsstellen vorhanden sind, hingegen nach der Translokation des Primerextensionsproduktes an die gegenüberliegende Oberfläche Bindungsstellen vorhanden sind. Die Art der Primerzugabe und der Reaktionsführung muss diesem Gesichtspunkt Rechnung tragen. Unter aktivierbaren Reaktivprimern werden im Sinne der Erfindung solche Primer verstanden, die eine reaktive Funktionalität besitzen und deren Reaktivität durch die Wahl geeigneter äußerer Bedingungen beeinflussbar ist.

Die Erfindung betrifft insbesondere aber auch ein Verfahren zur enzymatischen Vermehrung von Nukleinsäuren auf wenigstens zwei Oberflächen, umfassend einen oder mehrere der folgenden Amplifikationszyklen:

- a) Immobilisierung eines ersten Primers an einer ersten Oberfläche einer Festphase;
- b) Zugabe einer Lösung von Nukleinsäuren und Binden komplementärer Fragmente an den ersten Primer;
- c) Verlängerung des ersten Primers an seinem 3'-Ende, korrespondierend zu dem komplementären Fragment, durch eine Polymerase;
- d) Freisetzen der komplementären Fragmente;
- e) Anlagerung eines zweiten Primers an das 3'-Ende der verlängerten Nukleinsäure;
- f) Verlängerung des zweiten Primers an seinem 3'-Ende durch eine Polymerase;

- 7 -

- g) Übertragung des zweiten Primers an eine weitere Oberfläche und Immobilisierung des verlängerten Primers;
- h) Anlagerung eines weiteren ersten Primers an das 3'-Ende des zweiten, verlängerten Primers.

5 Daneben beschreibt die Erfindung aber auch in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zum Kopieren von Nukleinsäuren von einer ersten auf eine zweite Oberfläche, umfassend folgende Verfahrensschritte:

- a) Immobilisierung von Nukleinsäuren durch Reaktion mit der Oberfläche eines festen Trägers;
- 10 b) Erzeugung von doppelsträngigen Molekülen durch
 - ba) Hybridisierung komplementärer Einzelstränge; oder
 - bb) chemische oder enzymatische Ligation von komplementären Fragmenten;
 - bc) chemische oder enzymatische Verlängerung von komplementären Primern;
- 15 c) Übertragung der Komplementärstränge auf eine zweite Oberfläche und Immobilisierung derselben.

Bei allen vorgenannten erfindungsgemäßen Maßnahmen ist es bevorzugt, die Übertragung mittels eines elektrischen Feldes unter Erhalt der Ortsinformation vorzunehmen. Ebenfalls bevorzugt ist die räumliche Trennung der Oberflächen.

20

Dieses Verfahren ist nützlich für die Vermehrung von biologischem Material auf sogenannten "Genchips". Dabei ist es grundsätzlich (wie überhaupt in den erfindungsgemäßen Verfahren) unerheblich, ob das 5'-Ende, das 3'-Ende oder eine sequenzinterne Position als Ausgangspunkt für die Verknüpfung mit der Oberfläche dient.

25

Es ist bereits bekannt, eine große Anzahl immobilisierter polymerer Verbindungen auf einem Objektträger aufzubringen oder zu synthetisieren, um damit selektiv daran bindende Verbindungen nachzuweisen (Fodor et al., Science 251, 767-773,

1991; US 5,510,270, US 5,489,678, US 5,445,934, US 5,424,186). Dazu ist es allerdings zuvor notwendig, für den Herstellungsprozess solcher "Arrays" von Sonden, lithographische Masken herzustellen und zu verwenden und die monomeren Ausgangsverbindungen mit photolabilen Schutzgruppen zu versehen. Für einen
5 Syntheszyklus bei der Peptidsynthese benötigt man mindestens 20 solcher Masken je Syntheszyklus, bei n Zyklen also $n \times 20$ Masken; bei der Synthese von Oligonukleotiden benötigt man 4 solcher lithographischer Masken, für n Zyklen also $n \times 4$ Masken. Diese lithographischen Masken werden dazu benötigt, um an definierten räumlichen Stellen des "Arrays" eine Belichtung zu erlauben, an allen anderen
10 Stellen des "Arrays" jedoch nicht. An den definierten, belichteten Stellen wird eine lichtempfindliche Schutzgruppe abgespalten und dadurch eine reaktive Gruppe freigesetzt, an die im Anschluss ein neuer monomerer Baustein des Polymers binden kann. Durch vielfaches Anwenden von jeweils individuellen Masken und durch vielfache Wiederholung von Kopplungsprozessen werden solche "Arrays" aufgebaut.
15 Derartige Genchips wurden bislang also nach aufwendigen und äußerst kostenintensiven lithographischen Verfahren hergestellt (vgl. hierzu auch die US 5,700,637)).

Die Erfindung bietet daher überraschenderweise eine einfache Alternative zu derartigen Verfahren, die darüber hinaus noch wesentlich effizienter und genauer ist.
20 Aufgrund der Vielzahl von Informationen, die auf derartigen Genchips enthalten sein können, ist es sogar möglich, ganze Gen-Datenbanken, resp. Bibliotheken für Screeningzwecke bereitzustellen. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, daß die Nukleinsäuren auf dem festen Träger zweidimensional geordnet angeordnet sind und entsprechend dieser Ordnung übertragen werden. Die zweidimensionale Ordnung
25 kann im Sinne der Erfindung auch als "Unordnung" verstanden werden. Insbesondere bei großen Bibliotheken herrscht zwangsläufig keine Zuordnung hinsichtlich der Bindung einzelner Moleküle an bestimmte Orte. Bei einer Übertragung jedoch werden räumlich gesehen die nicht-zugeordneten Moleküle der Bibliothek mit ihrer ursprünglichen Ortsinformation übertragen. Es handelt sich also um eine Unordnung,
30 die gleichwohl geordnet unter Erhalt der Ortsinformation übertragen wird.

Einsatzgebiete der Erfindung sind beispielsweise die Herstellung von Genchips für diagnostische Zwecke in der Human- und Veterinärmedizin.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren können die erzeugten Kopien der Nukleinsäuren identisch oder komplementär zu der Ausgangssequenz (Matrize) sein. Unter "komplementär" im Sinne der Erfindung ist zu verstehen, dass die Kopie der Matrize sich von der Ausgangsmatrize unterscheidet, die Kopie dieser Kopie jedoch wieder
5 identisch mit der Ausgangsmatrize ist. Soweit erforderlich wird dies nachfolgend kurz mit "(+)-Strang" und "(-)-Strang" bezeichnet. Die Reaktionen erfolgen im selben Reaktionsgefäß. Unter Nukleinsäuren werden sowohl D- als auch L-Nukleinsäuren (Spiegelmere) verstanden, sowie jedwede Modifikation davon.

Auch können Immunreaktionen in Form von Immunoassays oder Radioimmunoassays (Antikörper-Antigen-Reaktionen) mit diesem erfindungsgemäßen Verfahren
10 durchgeführt werden.

Die Erfindung bietet bislang ungeahnte Vorteile bei allen bekannten - konventionellen - medizinisch-diagnostischen und biochemisch/ biotechnologisch/ gentechnologisch relevanten Methoden, weswegen sich vielfache Anwendungsgebiete anbieten.
15 Beispielhaft seien hier nur folgende Anwendungen genannt:

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur qualitativen und quantitativen Erfassung von DNA und RNA-Molekülen verwendet werden. Mit dem Verfahren können auch komplexe genetische Polymorphismen und multiple Allele simultan analysiert werden. Durch die Vermehrung der DNA oder RNA-Moleküle an festen Phasen
20 können Primerartefakte (z.B. Primer-Dimere) vermieden werden. Ein weiterer Vorteil ist darin zu sehen, dass die zu quantifizierende Probe nur zu Beginn des Verfahrens eingesetzt wird und dann alle Vermehrungsprodukte durch spezifische Bindungen auf den Oberflächen fest verankert sind. Damit können die in der PCR-Diagnostik häufig störenden Signale durch Verunreinigungen vermieden werden.
25 Die Reinheit der Oberflächen kann durch elektrostatische Abstoßung unspezifisch gebundener DNA- oder RNA-Moleküle verbessert werden. Das Verfahren kann daher in der funktionellen Genomik und der Pharmakogenomik eingesetzt werden (vgl. Oliver et al. Trans Biotechnol. 16, 373-378 (1998); Housman and Ledley, Nature Biotechnology 16, 492-493 (1998)).

30 Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Erfassung von differentieller Genexpression genutzt werden. Weiterhin lässt sich das Verfahren mit den im Stand

der Technik bekannten Methoden, wie z.B. Differential Display RT-PCR (DDRT-PCR), Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) oder differentieller Hybridisierung kombinieren (Wan et al., Nature Biotechnology 14, 1685-1691 (1996)). Durch Vergleich der Genexpression lassen sich beispielsweise neue pharmakologische Wirkorte auffinden.

Zur schnellen qualitativen und quantitativen Erfassung kann das Verfahren mit den im Stand der Technik bekannten Sensorverfahren, wie z.B. Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Sensoren, evaneszenten Feld-Sensoren, faseroptische Sensoren, Gitterkopplern oder RIFS (Reflektorische Interferometrische Spektroskopie) kombiniert werden (Scheller et al., Frontiers in Biosensorics, Birkhäuser Verlag Basel (1997)).

Die Erstellung von Gen- und Genombibliotheken nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann mit den im Stand der Technik bekannten Verfahren zur Ligation von Adaptern oder Linkern kombiniert werden. Ein besonderer Vorteil des Verfahrens besteht darin, dass bei Verwendung von zwei verschiedenen Primern für die Immobilisierung an den Oberflächen ausschließlich Moleküle mit zwei verschiedenen Adaptern oder Linkern vermehrt werden. Somit lassen sich die jeweils komplementären Einzelstränge auf den Oberflächen getrennt vermehren.

Darüber hinaus ist auch eine Kombination mit Verfahren möglich, die eine ortsgerichtete Immobilisierung sowie ein Umsortieren der an einer Oberfläche gebundenen Moleküle gestatten. Hierzu gehören einerseits Methoden, die auf Elektrodenarrays, bei denen eine oder mehrere bestimmte Mikroelektroden gezielt ansteuerbar sind, aufbauen. Die Elektrodenarrays können dabei z.B. durch Halbleiterchips realisiert werden, wie sie von der Firma Nanogen (www.nanogen.com) entwickelt wurden. Andererseits gehören hierzu Methoden, die eine Verwendung von Scanning-Techniken implizieren, bei denen piezoelektrische Elemente für eine höchstpräzise laterale Adressierung bis hin in den Sub-Nanometerbereich sorgen. Bevorzugt ist die Anwendung der Scanning Electrochemical Microscopy (SECM), die zur elektrochemischen Deposition der Moleküle und darüber hinaus in Verbindung mit elektrochemischen Proben zur Detektion einsetzbar ist. Aber auch Methoden wie die Atomic Force Microscopy (AFM) sind geeignet, einzelne Moleküle lateral zu translozieren.

Die nach dem Verfahren erstellten Bibliotheken können mit den im Stand der Technik bekannten Verfahren sequenziert werden, wie z.B. Sequenzierung durch Dideoxytermination nach Saenger, Sequenzierung durch chemische Spaltung nach Maxam und Gilbert, Sequenzierung durch Hybridisierung, Sequenzierung durch Kappilarelektrophorese oder MALDI-Massenspektrometrie (vgl. Adams, Fields, Venter in: Automated DNA Sequencing and Analysis, Academic Press, 1994).

Die erstellten Gen- und Genombibliotheken können für die Zuordnung von DNA- bzw. RNA-bindenden Faktoren eingesetzt werden. So lassen sich z.B. die spezifischen Bindungsorte für Transkriptionsaktivatoren oder Repressoren simultan erfassen. Die verwendeten Gen und Genombibliotheken können dabei einzelsträngig oder doppelsträngig sein.

Das Verfahren kann zur Gen und Genomsynthese sowie zur Rekombination genetischen Materials verwendet werden. Die in Fig. 7 (siehe unten) beschriebene Methode erlaubt die Verknüpfung beliebiger Fragmente mit nur partieller Komplementarität. Es bietet sich insbesondere an, offene Leseraster mit geeigneten Startsignalen für biologische Expressionssysteme zu versehen. Weiterhin kann das Verfahren mit der in vitro-Trankription und der in vitro-Translation gekoppelt werden. Da mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die Trankriptions- und Translationsprodukte unter Erhalt der Ortsinformation erzeugt werden können, lassen sich räumliche Anordnungen dieser Produkte auf Wechselwirkung mit weiteren Faktoren testen. Damit können funktionelle Zuordnungen simultan erfasst werden, die im Stand der Technik nur durch aufwendige Verfahren, wie z.B. das "Two Hybrid-System" gefunden werden (Fredericson, Curr. Opin. Biotechnol. 9, 90-96 (1998)). Damit können nach dem erfindungsgemäßen Verfahren neue pharmakologische Wirkorte gefunden bzw. neue diagnostische Strategien entwickelt werden.

Das Verfahren kann ferner mit dem im Stand der Technik bekannten Methoden zum Auffinden funktioneller Moleküle aus kombinatorischen Bibliotheken kombiniert werden. So kann z.B. ein Zielmolekül (Target) an einer ersten Oberfläche immobilisiert werden. Nach Kontakt mit einer kombinatorischen Nukleinsäure-Bibliothek können die nicht-bindenden RNA- oder DNA-Moleküle abgetrennt werden. Die bindenden Moleküle aus der kombinatorischen Bibliothek werden nach dem erfin-

dungsgemäßen Verfahren auf eine zweite Oberfläche übertragen und unter Erhalt der Ortsinformation vermehrt. Die Zusammensetzung der bindenden Moleküle kann durch Sequenzierung ermittelt werden.

5 Weiterhin kann durch zyklische Vorgehensweise eine evolutive Optimierung der bindenden Moleküle erfolgen. Die bereits selektierten Moleküle werden erneut mit den immobilisierten Zielmolekülen in Kontakt gebracht und wiederum vermehrt. Bei fehlerhafter Vermehrung entstehen Tochtermoleküle mit zum Teil verbesserten Bindungseigenschaften. Die Population der aus der Stammsequenz durch Mutation hervorgehenden Sequenz wird nach Eigen als Quasisequenz bezeichnet. Das er-
10 findungsgemäße Verfahren zeichnet sich nun dadurch aus, daß die Mitglieder der Quasispezies räumlich co-lokalisiert sind, wodurch das Konzept der Quasispezies mit einer lateralen Dimension versehen sind.

Unter immer stringenteren Bedingungen, wie z.B. Abnahme der Target-Konzentration und zunehmendes Spülen, läßt sich eine systematische Optimierung
15 der funktionellen Eigenschaften erreichen. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann der Selektionsdruck auch durch zunehmende elektrostatische Abstoßung erreicht werden. Weiterhin läßt sich das Verfahren mit den im Stand der Technik bekannten Methoden zur Selektion katalytischer Nukleinsäuren kombinieren (Tarosow et al., Nature 389, 54-57 (1997)).

20 Insbesondere bietet sich demnach die Verwendung des Verfahrens zur Klonierung genomischer Fragmente von DNA, cDNA und RNA an. Dies kann insbesondere unter Verwendung von replikativen Polymerasen, z.B. Polymerase III aus *Escherichia coli* geschehen; der Vorteil besteht in einer Vermeidung von Fehlern beim Replizierungsprozeß. Ferner bietet sich die Subklonierung nach Restriktionsverdau
25 an. Die Subklonierung spielt eine Rolle bei der Sequenzierung großer genomische Fragmente, wobei der Vorteil bei Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahren darin liegt, daß ein erheblicher Zeitgewinn bei der Sortierung großer Nukleinsäurebibliotheken erreichbar ist, wie beispielsweise durch Subklonierungstechniken wie "shotgun cloning" oder das Erzeugen gezielter Deletionsvarianten, z.B. Exonuklea-
30 se-III-Behandlung (vgl. Adams, Fields, Venter, in: Automated DNA Sequencing and Analysis, Academic Press, 1994).

Weiterhin ist die Verwendung des Verfahrens für das Sortieren von benachbarten Fragmenten durch Hybridisierungstechniken ("chromosome walking") vorteilhaft.

Aber auch die Verwendung des Verfahrens zum Kopieren von Genchips bietet ungeahnte Möglichkeiten. So können beispielsweise Genchips mit einer Bibliothek von
5 Virusantigenen als Ausgangsmaterial verwendet werden. Durch Reaktion mit Patientenblut und Bindung darin enthaltener Antikörper lässt sich eine Immunreaktion detektieren. Hier greift das erfindungsgemäße Verfahren nach Anspruch 9 ein und führt dazu, dass die identifizierten Antikörper auf eine Oberfläche transferiert werden (via die elektrische Ladung des Antikörpers). Das Verfahren lässt sich beliebig
10 oft wiederholen, was wiederum zu einer Signalverstärkung führt. Somit findet quasi eine lineare Vermehrung statt, die auch schwache Immunsignale identifizierbar macht. Dies macht beispielsweise in der AIDS-Diagnostik Sinn, wo ein besonderes Problem bekanntlich darin liegt, zu Beginn der Infektion dieselbe zu detektieren. Es ist mithin möglich, schon im Frühstadium Krankheiten oder Allergien nachzuweisen.
15 Das erfindungsgemäße Verfahren bietet sich jedoch auch für die exponentielle Vermehrung an, die bei Verwendung eines immobilisierbaren Antigens stattfinden kann. Ferner kann mittels Halbleitertechnologie und/oder einer Mikromanipulation ("align-Techniken") ein Sortiervorgang auf Genchips vorgenommen werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die geladenen Nukleinsäuren mit einer positiv geladenen Kopfgruppe zu versehen, die in der Gesamtladung überwiegt. Dadurch können
20 die Moleküle im elektrischen Feld ausgerichtet werden und erlauben damit eine hohe Beladungsdichte auf den Chips (DNA/RNA).

Mithin liegt auch die Verwendung des Verfahrens zur Verstärkung eines immunologischen Ligand/Rezeptor-Paares auf der Hand.

25 Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen enthalten. Die Erfindung ist in den anliegenden Zeichnungen dargestellt und wird nachfolgend näher beschrieben:

Die Figur 1 beschreibt ein allgemeines Verfahren zur Vermehrung von Liganden und Rezeptoren auf zwei Oberflächen; im einzelnen:

- (1) Ein Ligand wird durch eine Reaktion an der Oberfläche eines festen Trägers immobilisiert;
 - (2) Der Ligand bindet einen Rezeptor;
 - (3) Der Rezeptor wird auf eine zweite Oberfläche übertragen; dies geschieht wiederum durch Anlegen eines elektrischen Feldes; nach Kontakt mit der zweiten Oberfläche wird der Rezeptor durch eine Reaktion immobilisiert;
 - (4) Ein freier Ligand wird an den immobilisierten Rezeptor angelagert;
 - (5) Der Ligand wird auf die zweite Oberfläche übertragen (mit Hilfe eines elektrischen Feldes); dort wird er immobilisiert.
- Das Verfahren kann beliebig oft durchgeführt, resp. wiederholt werden.

Die Figur 1a beschreibt das Verfahren gemäß der Figur 1, wie es entsprechend der Figur 3a zu Figur 3 unten beschrieben ist.

Die Figur 2 beschreibt ein allgemeines Verfahren zur Vermehrung von Liganden und Rezeptoren auf wenigstens zwei Oberflächen; im einzelnen:

- (1) Ein Ligand wird durch eine Reaktion an der Oberfläche eines festen Trägers immobilisiert;
- (2) Der Ligand bindet einen Rezeptor;
- (3) Der Rezeptor wird auf die Oberfläche übertragen; dies geschieht wiederum durch Anlegen eines elektrischen Feldes; nach Kontakt mit der Oberfläche wird der Rezeptor durch eine Reaktion immobilisiert;
- (4) Ein freier Ligand wird an den immobilisierten Rezeptor angelagert;
- (5) Der Ligand wird auf der Oberfläche durch eine Reaktion immobilisiert.

Das Verfahren kann beliebig oft wiederholt werden.

- Die Figur 3 beschreibt ein Verfahren zur enzymatischen Vermehrung von Nukleinsäuren auf zwei Oberflächen, wobei die einzelnen Verfahrensschritte als Zeitraffer wie folgt dargestellt sind:

- (1) Ein erster Primer A wird durch eine Reaktion an der Oberfläche eines festen Trägers immobilisiert;
- (2) Der Primer A bindet aus einer Lösung von Nukleinsäuren komplementäre Fragmente;
- 5 (3) Der Primer A wird an seinem 3'-Ende durch eine Polymerase verlängert;
- (4) Die komplementären Fragmente werden freigesetzt;
- (5) Ein zweiter Primer B wird an das 3'-Ende der verlängerten Nukleinsäure angelagert;
- (6) Der Primer B wird an seinem 3'-Ende durch eine Polymerase verlängert;
- 10 (7) Der verlängerte, nicht immobilisierte Primer B wird auf eine zweite Oberfläche übertragen; dies geschieht vorzugsweise durch Anlegen eines elektrischen Feldes, wobei die beiden Oberflächen jeweils entgegengesetzt gepolt sind. Nach Kontakt mit der zweiten Oberfläche wird der verlängerte Primer B durch eine Reaktion dort immobilisiert;
- 15 (8) Ein weiterer Primer A wird an das 3'-Ende des verlängerten Primers B angelagert;
- (9) Der Primer A wird an seinem 3'-Ende durch eine Polymerase verlängert;
- (10) Der verlängerte Primer A wird auf die erste oder eine weitere Oberfläche übertragen. Auch dies geschieht wieder durch Anlegen eines elektrischen Feldes, wobei die beiden Oberflächen jeweils entgegengesetzt gepolt sind, diesmal aber (anders als in Schritt (7)) mit umgekehrten Vorzeichen. Nach Kontakt mit der Oberfläche wird der verlängerte Primer A durch eine Reaktion dort immobilisiert;
- 20 (11) Ein weiterer Primer B wird an das 3'-Ende des verlängerten Primers A angelagert.
- 25

Das Verfahren wird dann beliebig oft fortgesetzt, vorzugsweise durch zyklisiertes Umpolen.

Die Figur 3a beschreibt das Verfahren gemäß der Figur 3, wobei allerdings zwischen den beiden Oberflächen eine Zwischenschicht angeordnet ist. Diese Zwischenschicht ist ausgewählt aus der Gruppe eines Gels, einer Membran, eines Po-

30

lymeren, einer Keramik und/oder eines sogenannten Capillar Tube Arrays. Durch die Zwischenschicht wandert bei Anlegen eines elektrischen Feldes das nicht immobilisierte Molekül auf die zweite Oberfläche, wo es immobilisiert wird.

5 Die Figur 4 beschreibt dagegen zur Veranschaulichung ein grundsätzliches Verfahren zur enzymatischen Vermehrung von Nukleinsäuren auf nur einer Oberfläche; im einzelnen:

- (1) Ein erster Primer A wird durch eine Reaktion an der Oberfläche eines festen Trägers immobilisiert;
- 10 (2) Der Primer A bindet aus einer Lösung von Nukleinsäuren komplementäre Fragmente;
- (3) Der Primer A wird an seinem 3'-Ende durch eine Polymerase verlängert;
- (4) Die komplementären Fragmente werden freigesetzt;
- (5) Ein zweiter Primer B wird an das 3'-Ende der verlängerten Nukleinsäure angelagert;
- 15 (6) Der Primer B wird an seinem 3'-Ende durch eine Polymerase verlängert;
- (7) Der verlängerte, nicht immobilisierte Primer B wird an der Oberfläche durch eine irreversible Reaktion gebunden; dies geschieht vorzugsweise durch Anlegen eines elektrischen Feldes, wobei der geladene Primer B entlang des Feldes geführt wird;
- 20 (8) Ein weiterer Primer A wird an das 3'-Ende des verlängerten Primers B angelagert;

Das Verfahren kann beliebig fortgesetzt werden.

Die Figur 5 hingegen zeigt ein Verfahren zum Kopieren von Nukleinsäuren auf eine zweite Oberfläche; im einzelnen:

- 25 (1) Immobilisierung von Nukleinsäuren durch Reaktion mit der Oberfläche eines festen Trägers;
- (2) Erzeugung von doppelsträngigen Molekülen durch Hybridisierung komplementärer Einzelstränge; alternativ kann aber auch chemische oder enzyma-

tische Ligation von komplementären Fragmenten erfolgen oder chemische oder enzymatische Verlängerung von komplementären Primern;

- (3) Übertragung der Komplementärstränge auf eine zweite Oberfläche und Immobilisierung derselben; dies geschieht vorzugsweise durch Anlegen eines elektrischen Feldes, wobei die beiden Oberflächen jeweils entgegengesetzt gepolt sind.

Die Figur 6 zeigt in schematischer Ansicht zwei Koordinatensysteme mit zahlreichen Feldern, die hier zwei Oberflächen versinnbildlichen sollen, wie sie beispielsweise bei Genchips oder auf Membranen zur Anwendung kommen. Die untere Oberfläche enthält die zu kopierende Information, die durch Anlegen eines (nicht dargestellten) elektrischen Feldes entsprechend dem Verfahren nach Figur 3 auf die obere Oberfläche übertragen und dort immobilisiert wird.

Die Figur 7 zeigt ein Verfahren zur Gen- und Genom-Synthese, sowie zur Rekombination; im einzelnen:

- (1) Ein Primer A wird durch eine Reaktion an der Oberfläche eines festen Trägers immobilisiert;
- (2) Der Primer A bindet aus einer Lösung von Nukleinsäuren komplementäre Fragmente;
- (3) Der Primer A wird an seinem 3'-Ende durch eine Polymerase verlängert;
- (4) Die komplementären Fragmente werden freigesetzt.
- (5) Ein zweites Fragment, das zum 3'-Ende des verlängerten Primers A komplementär ist, wird angelagert, wobei auch teilkomplementäre Fragmente ausreichen, deren 3'-Ende überhängen;
- (6) Der verlängerte Primer A wird elongiert.
- (7) Die komplementären Fragmente werden freigesetzt. Die Schritte (5)-(7) können beliebig oft wiederholt werden.
- (8) Ein zweiter Primer B wird an das 3'-Ende der verlängerten Nukleinsäure angelagert.
- (9) Der Primer B wird an seinem 3-Ende durch eine Polymerase verlängert.

- (10) Der verlängerte Primer B wird wie in Fig. 1, Schritt 7 beschrieben auf eine zweite Oberfläche übertragen. Dieser Schritt hat den Vorteil, daß unvollständig verlängerte Primer A-Moleküle abgetrennt werden. Der verlängerte Primer B kann erneut für Verlängerungsreaktionen eingesetzt werden.
- 5 Die Figur 8 zeigt ein Verfahren zur gezielten Mutagenese von Nukleinsäuren (site-directed Mutagenesis); im einzelnen:
- (1) Eine Nukleinsäure A wird durch eine Reaktion an der Oberfläche eines festen Trägers immobilisiert; die Nukleinsäure kann eines der Produkte der vorgenannten Verfahren sein;
- 10 (2) Die Nukleinsäure A bindet aus einer Lösung von Nukleinsäuren komplementäre Fragmente, die Fehlbasenpaarungen aufweisen (Mutationsfragment); weiterhin wird ein Primer B angelagert; das Mutationsfragment kann auch identisch mit dem Primer B sein;
- (3) Das Mutationsfragment und der Primer B werden verlängert;
- 15 (4) Die verlängerten Moleküle werden miteinander ligiert;
- (5) Der verlängerte Primer B wird wie in Fig. 1, Schritt 7 beschrieben auf eine zweite Oberfläche übertragen; diese Vorgehensweise hat den Vorteil, daß auf der zweiten Oberfläche nur mutierte Moleküle vorliegen.

Die Erfindung sei an folgendem Ausführungsbeispiel erläutert, nämlich an einem
20 Verfahren zur Vermehrung von Nukleinsäuren an zwei Oberflächen:

Die Synthese des Primers A führte zu einem Biotin-Label an seinem 5'-Ende; hingegen enthielt der Primer B an seinem 5'-Ende ein Fluoreszein-Label. Die Label wurden nach im Stand der Technik üblichen Verfahren, wie z.B. der Phosphoramidit-chemie hergestellt. Der Primer A wurde an eine Membran A gekoppelt. Als Membran wurde eine für Nukleinsäuren durchlässige bekannte Papiermembran verwendet, die hier als Oberfläche fungierte.

25

Diese Membran enthielt kovalent gekoppeltes Streptavidin. Durch die Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung fand die Kopplung statt. Ein zum Primer A komplementärer DNA-Strang wurde an diesen Primer A anhybridisiert. Der Primer A

wurde durch Taq-Polymerase oder durch das Klenow-Fragment der Polymerase I am 3'-Ende verlängert. Anschließend wurde durch Erhitzen auf 90°C denaturiert (alternativ kann auch eine Denaturierung durch ein übliches Denaturierungsreagenz erfolgen). Zum Anhybridisieren des Primers B wurde die Denaturierungslösung gegen eine Lösung, enthaltend TRIS-Borat-EDTA-Puffer ausgetauscht. Der Primer B wurde anschließend ebenso verlängert wie zuvor der Primer A (vgl. Figur 3 und 4).

In einer herkömmlichen Elektrophoreseapparatur wurde die Membran A auf ein Gel, vorzugsweise PAGE-Gel, gelegt. Auf der Rückseite des Gels wurde vorher eine Membran B aufgebracht, an der zuvor Fluoreszein-Antikörper immobilisiert wurden. Dieses "Sandwich" wurde mechanisch in einem Rahmen gehalten, stabilisiert und in eine Elektrophoresekommer eingeführt, die dergestalt war, daß die beiden Puffer voneinander getrennt waren, d.h., daß das Sandwich den Anoden- und Kathodenraum trennte. Bei Anlegen einer Spannung, die der Dicke des Gels angepaßt war (hier 300 V), wurde nachfolgend in das Elektrolyt ein denaturierendes Agens in den (-)-Raum eingespült (z.B. Harnstofflösung). Nach Erhitzen auf 70°C wurde elektrophoretisiert. Dabei löste sich der verlängerte Primer B und wanderte durch die Gelschicht auf die Membran B, wo er anschließend durch Bindung an den Fluoreszein-Antikörper gebunden und immobilisiert wurde.

Anschließend wurde das Sandwich aus der Elektrophoresekommer entfernt, die Membranen vom Gel entfernt und an der Membran B wurde nach den oben beschriebenen Methoden der Primer A wiederum anhybridisiert und verlängert. Beide Membranen wurden auf ein frisches PAGE-Gel gelegt, in der Gestalt, daß die beiden Membranen in der ursprünglichen Orientierung unter Erhalt der Ortsinformationen, paßgenau ausgerichtet wurden. Anschließend wurde wie oben beschrieben die Elektrophorese durchgeführt, allerdings in der Weise, daß die vorher im (+)-Raum (Anodenraum) befindliche Membran B nunmehr im (-)-Raum (Kathodenraum) angeordnet war.

Alternativ kann das Experiment in einer Mikrofluid-Apparatur durchgeführt werden, bei dem die Membranen und die Elektroden fest orientiert sind, der Anoden- und Kathodenraum jedoch unterschiedlich voneinander gespült und mit den entsprechenden Reagenzien gespült werden kann. In dieser Apparatur verwendet man

schwach quervernetzte Gele, wie sie in der Kapillarelektrophorese üblich sind. Diese Gele werden dann bei jedem Vorgang ausgewechselt.

Ferner kann das Experiment alternativ mit aktivierbaren Reaktivprimern durchgeführt werden. Unter aktivierbaren Reaktivprimern werden im Sinne der Erfindung
5 solche Primer verstanden, die eine reaktive Funktionalität besitzen und deren Reaktivität durch die Wahl geeigneter äußerer Bedingungen beeinflussbar ist. Solche äußere Bedingungen können chemischer, elektrochemischer oder photochemischer Art sein. Ein Beispiel für einen aktivierbaren Reaktivprimer ist ein Oligonukleotid, das über einen Aminolinker eine Cysteineinheit besitzt, deren Thiolgruppe als 2'-
10 Thiopyridyldisulfidgruppe geschützt ist. Die Membran enthält in diesem Fall Carboxygruppen in Form reaktiver Thioester. Beim Anhybridisieren werden redoxneutrale Reaktionsbedingungen verwendet. Nach Durchwandern des Feldes gelangt der verlängerte Primer auf eine Membran, an/in der reduzierende Bedingungen herrschen. Reduktive Bedingungen werden geschaffen durch die Vorlage oder Anwesenheit von z.B. Thiolen wie Dithioerythrit oder Dithiotreitol. In Gegenwart dieser
15 Reagenzien kommt es unter Disulfidaustauschreaktionen zu einer Abspaltung von 2-Thiopyridon, so daß die nunmehr freigesetzte Thiolgruppe am verlängerten Primer mit dem Thioester an der Membran reagieren kann. Bei der Reaktion wird primär ein Thioester gebildet, der durch die benachbarte intramolekulare Aminogruppe
20 des Cysteins zum Amid abreagiert.

Weitere Verwendungsmöglichkeiten der Erfindung sind in den folgenden Figuren wie folgt beschrieben:

Die Figur 9 zeigt ein Verfahren zur Klonierung und Sequenzierung genomischer Fragmente.

- 25 (1) Nach Restriktionsverdau werden die DNA-Fragmente mit zwei verschiedenen Linkern ligiert, die die Sequenz zu zu verwendenden Primer A und B vorgeben. Die genomischen Fragmente werden durch das Verfahren gemäß Fig. 3 vereinzelt. Bei der Vermehrung werden nur die Fragmente amplifiziert, die verschiedene Linker tragen.

- (2) Die so vereinzelt und amplifizierten Fragmente werden durch Hybridisierungstechniken sortiert ("chromosome walking").
- (3) Die sortierten Fragmente werden einzeln vermehrt, mit Restriktionsendonukleasen gespalten und subkloniert.
- 5 (4) Die subklonierten Fragmente können erneut durch Hybridisierungstechniken sortiert werden. Die Fragmente werden dann der Sequenzanalyse zugeführt.

Die Figur 10 zeigt ein Verfahren zur funktionellen Analyse von genomischen Fragmenten.

- (1) DNA Fragmente werden, wie in Figur 9 beschrieben, sortiert.
- 10 (2) Die einzelsträngigen Fragmente werden durch chemische oder enzymatische Synthese zum Doppelstrang ergänzt.
- (3) Die Fragmente werden mit Faktoren (z.B. Repressorproteine, Aktivatorproteine) in Kontakt gebracht. Der Nachweis der spezifischen Bindung an bestimmte Nukleinsäurefragmente erlaubt die funktionelle Zuordnung des Faktors im genomischen Kontext.
- 15

Die Figur 11 zeigt ein Verfahren zur parallelen Quantifizierung der Genexpression.

- (1) Nach reverser Transkription von mRNA werden die DNA-Fragmente, wie in Figur 9 beschrieben, mit Linkern versehen und vereinzelt.
- (2) Die cDNA-Fragmente werden sortiert.
- 20 (3) Die cDNA-Fragmente werden sequenziert.
- (4) Kopien der sortierten und sequenzierten Bibliotheken werden mit zellulären mRNAs einer gesunden Zelle in Kontakt gebracht. Die spezifischen Hybridisierungsereignisse werden durch im Stand der Technik bekannte Verfahren (z.B. Fluoreszente Reportergruppen) nachgewiesen.

- (5) In analoger Weise werden die zellulären mRNAs einer pathologisch veränderten Zelle (z.B. Tumorzelle) mit einer weiteren Kopie der Bibliothek in Kontakt gebracht.
- (6) Der Vergleich der derartig quantifizierten Genexpressionsmuster erlaubt die Identifizierung der mit der Erkrankung verbundenen Gene.

Die Figur 12 zeigt die Verwendung des Verfahrens zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses beim Nachweis .

- (1) Eine Bibliothek wird nach dem in Figur 9 oder Figur 11 beschriebenen Verfahren hergestellt.
- (2) Die Bibliothek wird mit der zu analysierenden einzelsträngigen DNA oder RNA in Kontakt gebracht.
- (3) Die hybridisierenden DNAs oder RNAs werden auf eine gegenüberliegende Oberfläche unter Erhalt der Ortsinformation übertragen.
- (4) Die Schritte 2 und 3 werden wiederholt.
- (5) Der Schritt 4 kann beliebig oft durchgeführt, resp. wiederholt werden. Die Signalmessung kann unter Verwendung von sensitiven Scanning-Techniken, wie z.B. Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) oder Atomic Force Microscopy (AFM) erfolgen.

Die Figur 13 zeigt die Verwendung des Verfahrens zur funktionellen Zuordnung von Proteinen.

- (1) Eine Bibliothek wird nach dem in Figur 9 oder Figur 11 beschriebenen Verfahren hergestellt, wobei einer der beiden verwendeten Linker eine Startsequenz für eine RNA Polymerase enthält. Der Promotor kann auch nachträglich durch das in Figur 7 beschriebene Verfahren angehängt werden.
- (2) Die DNA-Fragmente werden sortiert.

- (3) Die einzelsträngigen Fragmente werden durch chemische oder enzymatische Synthese zum Doppelstrang ergänzt.
- (4) Die doppelsträngigen DNA-Fragmente werden durch in vitro-Transkription in RNA übersetzt. Die entstehenden RNAs werden durch Anlegen eines elektrischen Feldes unter Erhalt der Ortsinformation auf eine neue Oberfläche übertragen.
- (5) Die RNA-Bibliothek wird durch in vitro-Translation in Proteine übersetzt. Die entstehenden Proteine werden durch Anlegen eines elektrischen Feldes unter Erhalt der Ortsinformation auf eine neue Oberfläche übertragen. Da Proteine sehr unterschiedliche Nettoladungen aufweisen können, wird der in vitro Translationsschritt vorzugsweise wiederholt, wobei der Transferschritt mit entgegengesetzter Polarität durchgeführt wird.
- (6) Die Proteinbibliothek wird mit einem oder mehreren Faktoren (Proteine, RNAs, DNAs, andere Moleküle biologischen oder chemischen Ursprungs) in Kontakt gebracht. Die spezifischen Bindungssereignisse werden durch im Stand der Technik bekannte Verfahren nachgewiesen. Der Nachweis der spezifischen Bindung erlaubt die simultane Erfassung funktioneller Wechselwirkungen.
- Die Figur 14 zeigt die Verwendung des Verfahrens zum Screening von kombinatorischen Proteinbibliotheken.
- (1) Eine Oligonukleotidbibliothek wird nach im Stand der Technik bekannten Verfahren durch chemische Synthese hergestellt.
- (2) Die Oligonukleotidbibliothek wird durch das in Figur 7 beschriebene Verfahren in 3'- und 5'-terminaler Richtung verlängert. Die verlängernden Sequenzen kodieren z.B. für die konstanten Regionen eines single chain-Antikörpers.
- (3) Die einzelsträngigen Fragmente werden durch chemische oder enzymatische Synthese zum Doppelstrang ergänzt.

- (4) Die doppelsträngigen DNA-Fragmente werden durch in vitro-Transkription in RNA übersetzt. Die entstehenden RNAs werden durch Anlegen eines elektrischen Feldes unter Erhalt der Ortsinformation auf eine neue Oberfläche übertragen.
- 5 (5) Die RNA-Bibliothek wird durch in vitro-Translation in Proteine übersetzt. Die entstehenden Proteine werden durch Anlegen eines elektrischen Feldes unter Erhalt der Ortsinformation auf eine neue Oberfläche übertragen.
- 10 (6) Die Proteinbibliothek wird mit einem oder mehreren Faktoren (Proteine, RNAs, DNAs, andere Moleküle biologischen oder chemischen Ursprungs) in Kontakt gebracht. Die spezifischen Bindungssereignisse werden durch im Stand der Technik bekannte Verfahren nachgewiesen. Der Nachweis der spezifischen Bindung erlaubt die simultane Erfassung funktioneller Wechselwirkungen.
- 15 Bei allen vorgestellten Verfahrensalternativen ist es möglich innerhalb des jeweiligen Übertragungsschritts des jeweiligen Verfahrensablaufs den (geometrischen) Maßstab der Übertragung unter Erhalt der Ortsinformation zu verändern, resp. zu verkleinern und/oder zu vergrößern. Dies ist z.B. dann zweckmäßig, wenn die Geometrie der Arrays, von denen übertragen wird bzw. auf die übertragen wird, nicht identisch mit dem Ausgangsarray bzw. Zielarray sind.

20

Patentansprüche

1. Verfahren zur Vermehrung von Liganden und Rezeptoren auf wenigstens zwei Oberflächen, umfassend einen oder mehrere der folgenden Zyklen:
 - a) Immobilisierung eines Liganden an einer ersten Oberfläche einer Festphase;
 - 5 b) Zugabe einer Lösung von Rezeptoren und Binden komplementärer Rezeptoren an den Liganden;
 - c) Übertragung des Rezeptors an eine weitere Oberfläche und dortige Immobilisierung des Rezeptors;
 - d) Anlagerung eines weiteren Liganden an den immobilisierten Rezeptor;
 - 10 e) Übertragung des Liganden an eine Oberfläche und dortige Immobilisierung des Liganden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Oberfläche in Schritt (c) und/oder (e) eine zweite, von der ersten räumlich getrennte Oberfläche ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Übertragung in Schritt (c) und
15 (e) durch Anlegen eines elektrischen Feldes erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, wobei das elektrische Feld zwischen der ersten und zweiten Oberfläche angelegt wird.
5. Verfahren zur enzymatischen Vermehrung von Nukleinsäuren auf wenigstens zwei Oberflächen, umfassend einen oder mehrere der folgenden Amplifikationszyklen:
 - a) Immobilisierung eines ersten Primers an einer ersten Oberfläche einer Festphase;
 - b) Zugabe einer Lösung von Nukleinsäuren und Binden komplementärer Fragmente an den ersten Primer;
 - 20 c) Verlängerung des ersten Primers an seinem 3'-Ende, korrespondierend zu dem komplementären Fragment, durch eine Polymerase;
 - d) Freisetzen der komplementären Fragmente;
 - 25 e) Anlagerung eines zweiten Primers an das 3'-Ende der verlängerten Nukleinsäure;

- f) Verlängerung des zweiten Primers an seinem 3'-Ende durch eine Polymerase;
 - g) Übertragung des zweiten Primers an eine weitere Oberfläche und Immobilisierung des verlängerten Primers.
 - 5 h) Anlagerung eines weiteren ersten Primers an das 3'-Ende des zweiten, verlängerten Primers;
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Oberfläche in Schritt (g) eine zweite, von der ersten räumlich getrennte, Oberfläche ist.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, wobei die Übertragung in Schritt (g) durch
- 10 Anlegen eines elektrisches Feldes erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 6 und 7, wobei das elektrische Feld zwischen der ersten und zweiten Oberfläche angelegt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 6, wobei nach Übertragung auf die zweite Oberfläche die folgenden Amplifikationsschritte erfolgen:
- 15 a) Verlängerung dieses ersten Primers an seinem 3'-Ende, korrespondierend zu dem komplementären Fragment, durch eine Polymerase;
- b) Übertragung des verlängerten Primers auf die erste oder eine weitere Oberfläche und Immobilisierung des Primers;
- c) Anlagerung eines weiteren zweiten Primers an das 3'-Ende des verlängerten ersten Primers.
- 20 10. Verfahren zum Kopieren von Nukleinsäuren von einer ersten auf eine zweite Oberfläche, umfassend folgende Verfahrensschritte:
- a) Immobilisierung von Nukleinsäuren durch Reaktion mit der Oberfläche eines festen Trägers;
- 25 b) Erzeugung von doppelsträngigen Molekülen durch
- ba) Hybridisierung komplementärer Einzelstränge; oder
- bb) chemische oder enzymatische Ligation von komplementären Fragmenten;
- bc) chemische oder enzymatische Verlängerung von komplementären Primern;
- 30 c) Übertragung der Komplementärstränge auf eine zweite Oberfläche und Immobilisierung derselben.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Übertragung in Schritt (c) durch Anlegen eines elektrisches Feldes erfolgt, wobei das elektrische Feld zwischen der ersten und zweiten Oberfläche angelegt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Nukleinsäuren auf dem festen Träger zweidimensional geordnet angeordnet sind und entsprechend dieser Ordnung unter Erhalt der Ortsinformation übertragen werden.
13. Verfahren nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Festphasenmaterial ausgewählt ist aus organischem oder anorganischem Material oder aus einem Hybrid dieser Materialien und eine zwei- oder dreidimensionale Matrix darstellt.
14. Verfahren nach wenigstens einem der vorhergehenden Anspruch, wobei die Immobilisierung durch kovalente oder nicht-kovalente Bindung erfolgt.
15. Verfahren nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuren, Liganden, Rezeptoren oder deren Derivate mit einem detektierbaren Label versehen sind.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das Label ausgewählt ist aus der Gruppe der Radioisotope, der stabilen Isotope, der Enzyme, der immunreaktiven Verbindungen, der Fluoreszenz- oder Lumineszenz-Chemikalien, der Chromophore, der Metalle oder geladener Teilchen.
17. Verfahren nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Lösung von Nukleinsäuren D- und/oder L-Nukleinsäuren umfasst.
18. Verfahren nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zwischen den Oberflächen eine für die Nukleinsäuren und/oder Liganden/Rezeptoren durchlässige Zwischenschicht angeordnet ist.
19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Zwischenschicht ausgewählt ist aus der Gruppe eines Gels, einer Membran, eines Polymeren, einer Keramik und/oder eines sogenannten Capillar Tube Arrays.
20. Verfahren nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuren mit einer positiv geladenen Kopfgruppe versehen sind.
21. Verfahren nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei beim jeweiligen Übertragungsschritt innerhalb des jeweiligen Verfahrensablaufs der Maßstab unter Erhalt der Ortsinformation verkleinert und/oder vergrößert werden kann.

22. Verwendung des Verfahrens nach den Ansprüchen 5 bis 9 zur Klonierung genomischer Fragmente von DNA, cDNA und RNA.
23. Verwendung nach Anspruch 22 zur Subklonierung nach Restriktionsverdau.
24. Verwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 zur Verstärkung eines immunologischen Ligand/Rezeptor-Paares.
- 5 25. Verwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 zur Verstärkung des Ligandensignals.
26. Verwendung des Verfahrens nach Anspruch 5 für das Sortieren von benachbarten Fragmenten durch Hybridisierungstechniken (chromosome walking).
- 10 27. Verwendung des Verfahrens nach Anspruch 10 zum Kopieren von Geochips.

Fig. 1

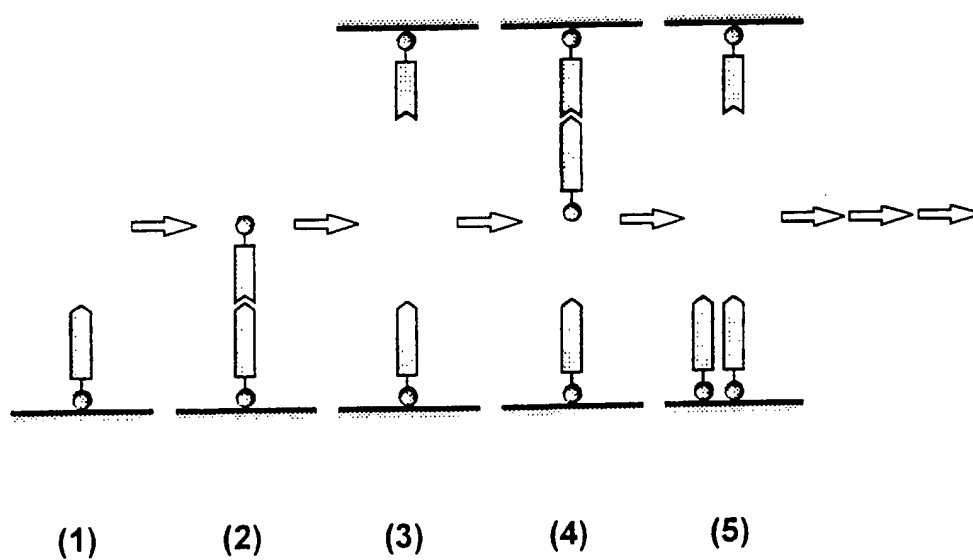


Fig. 1a

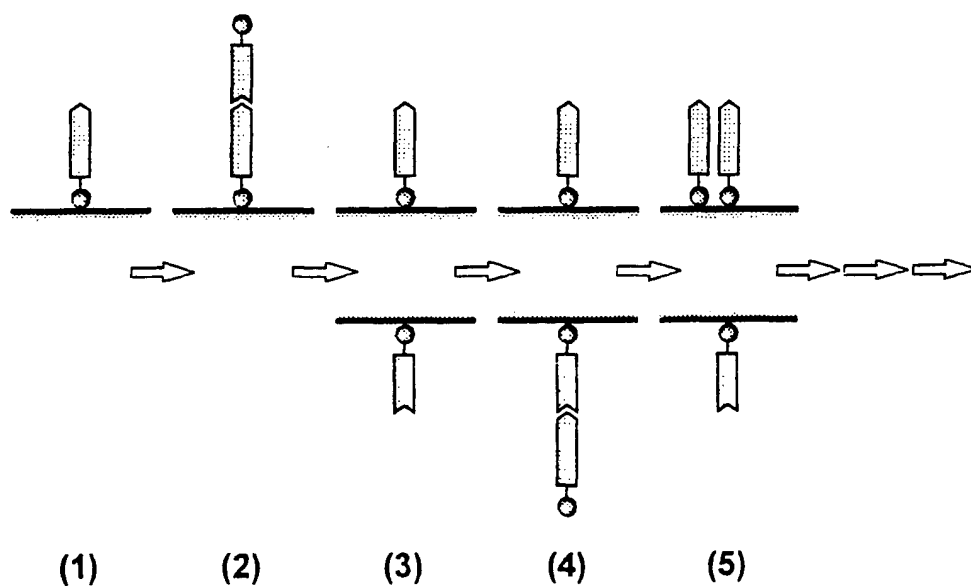


Fig. 2

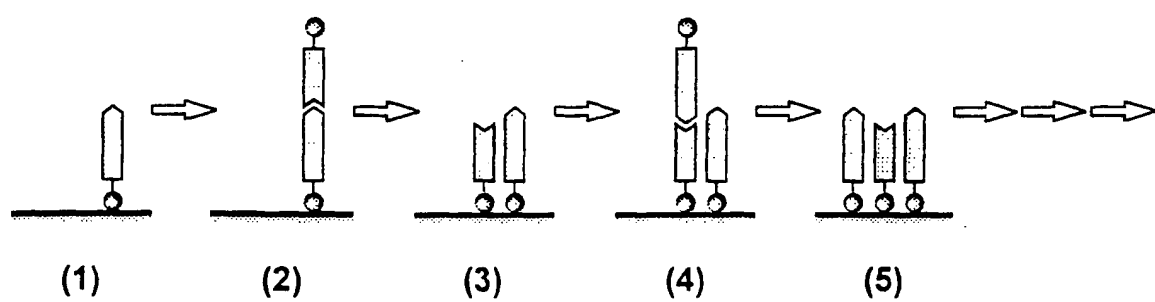


Fig. 3

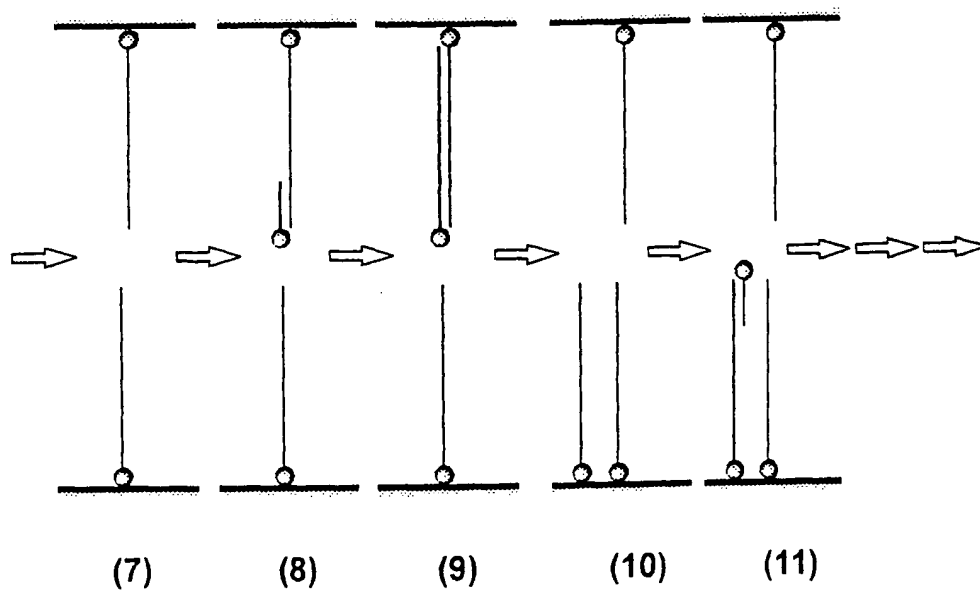
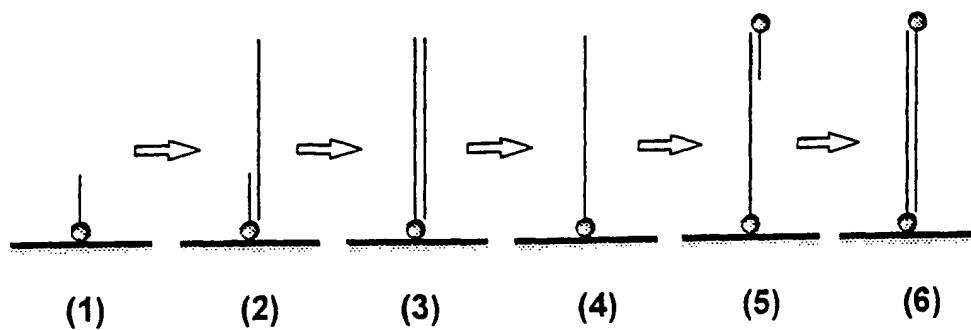


Fig. 3a

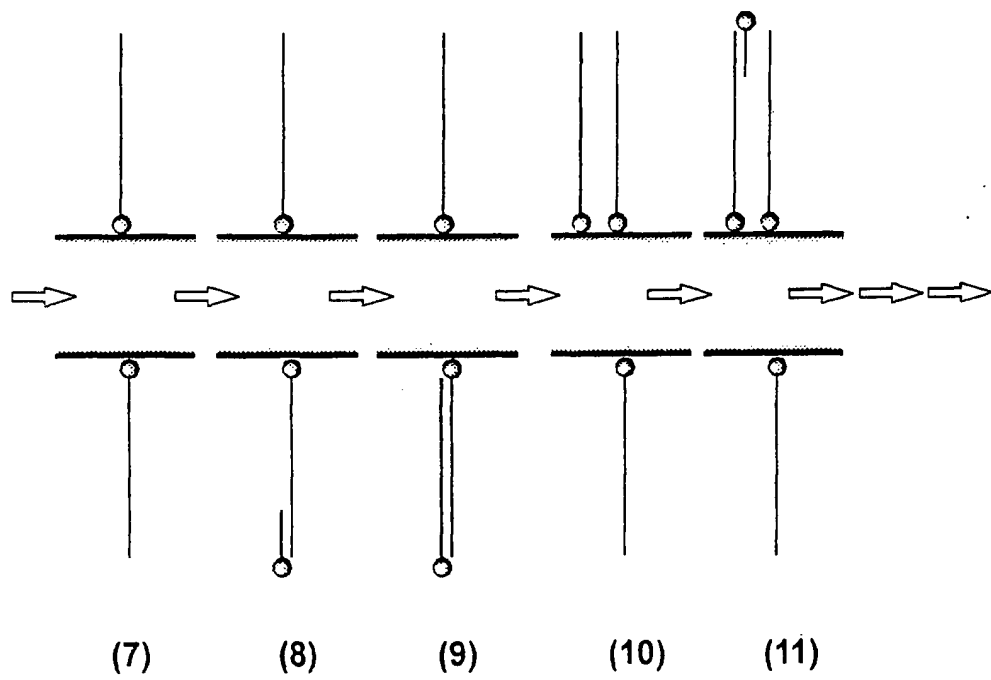
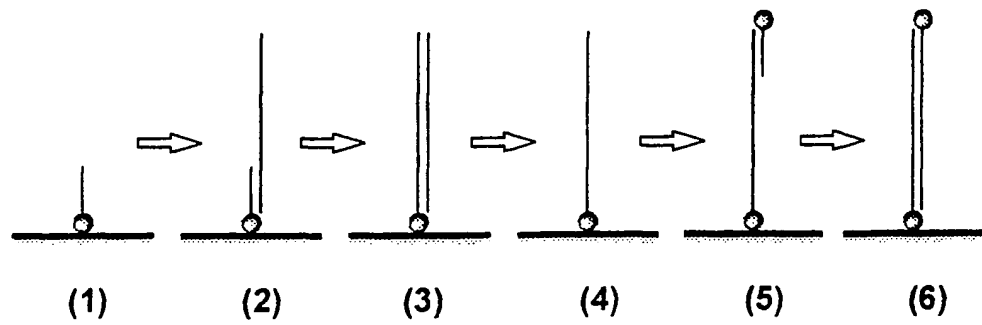


Fig. 4

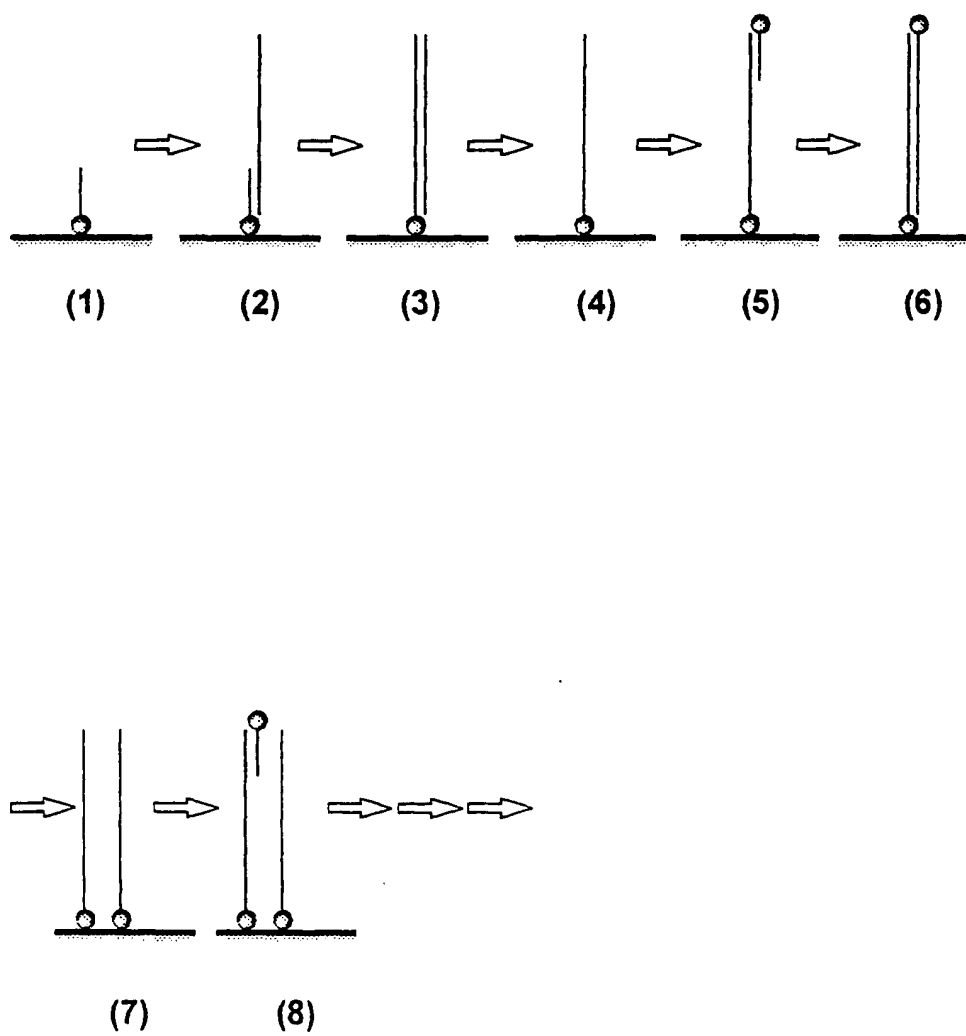
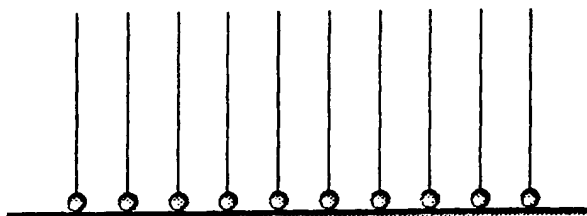
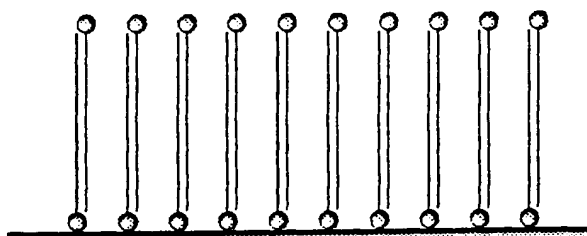


Fig. 5

(1)



(2)



(3)

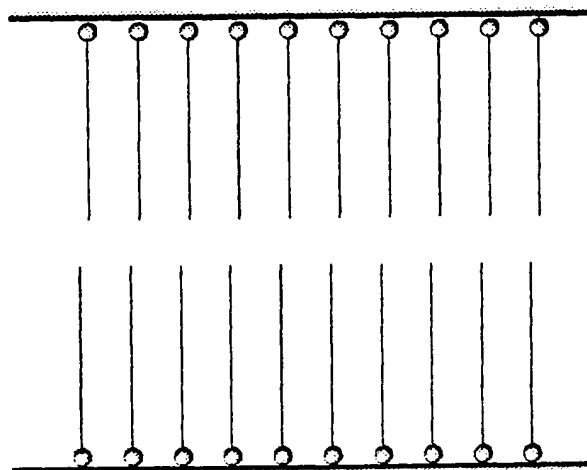


Fig. 6

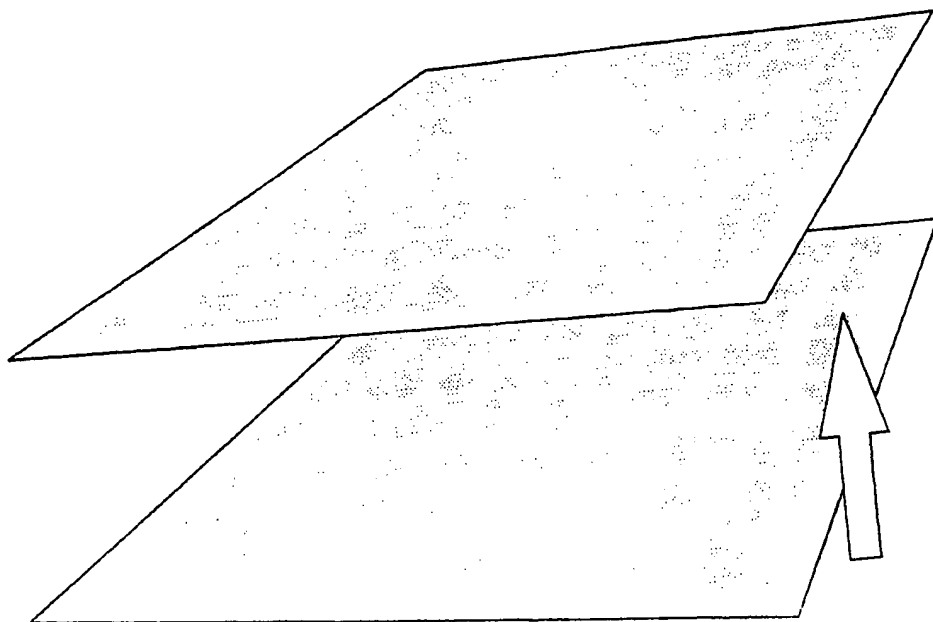


Fig. 7

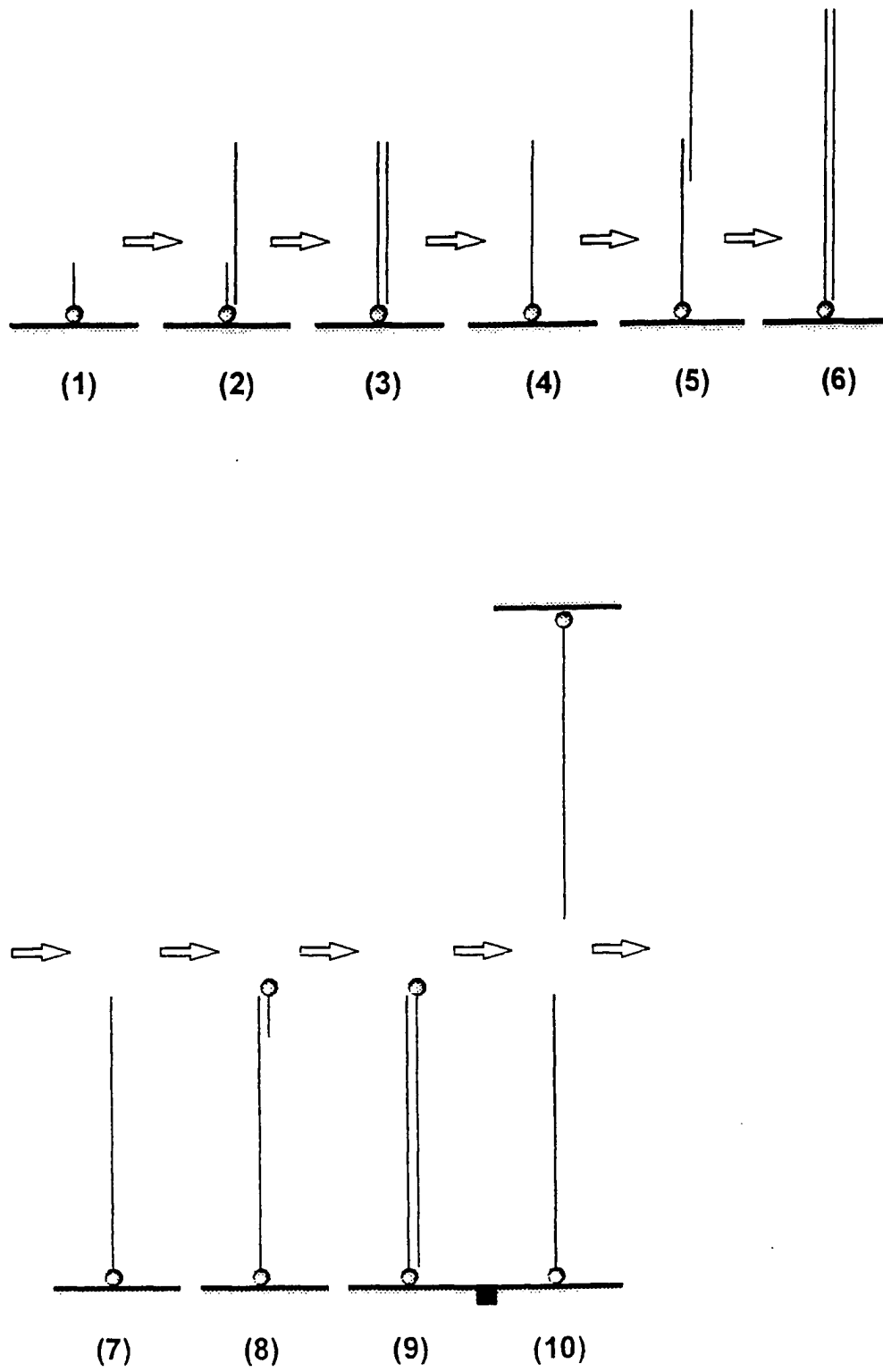


Fig. 8

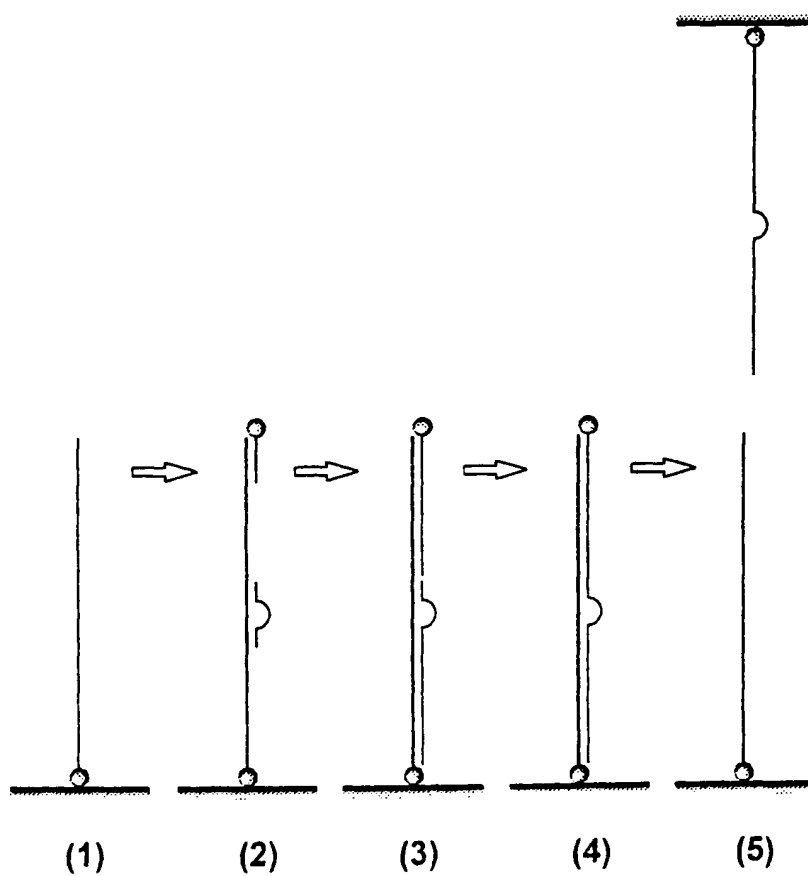


Fig. 9

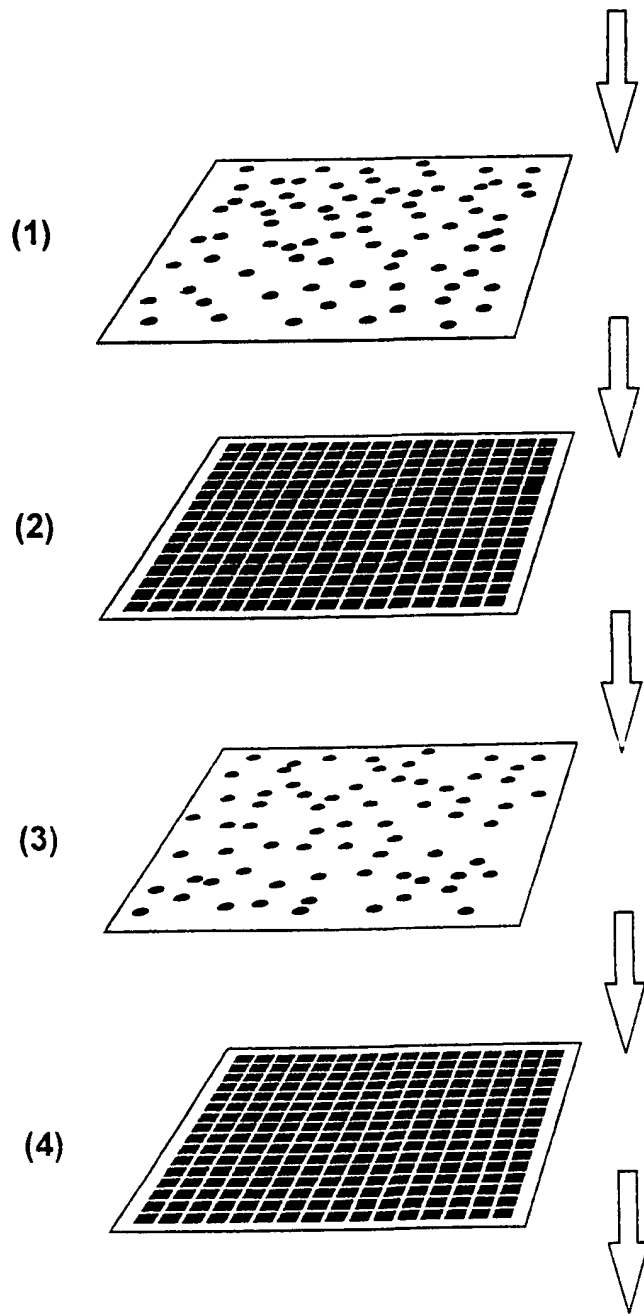


Fig. 10

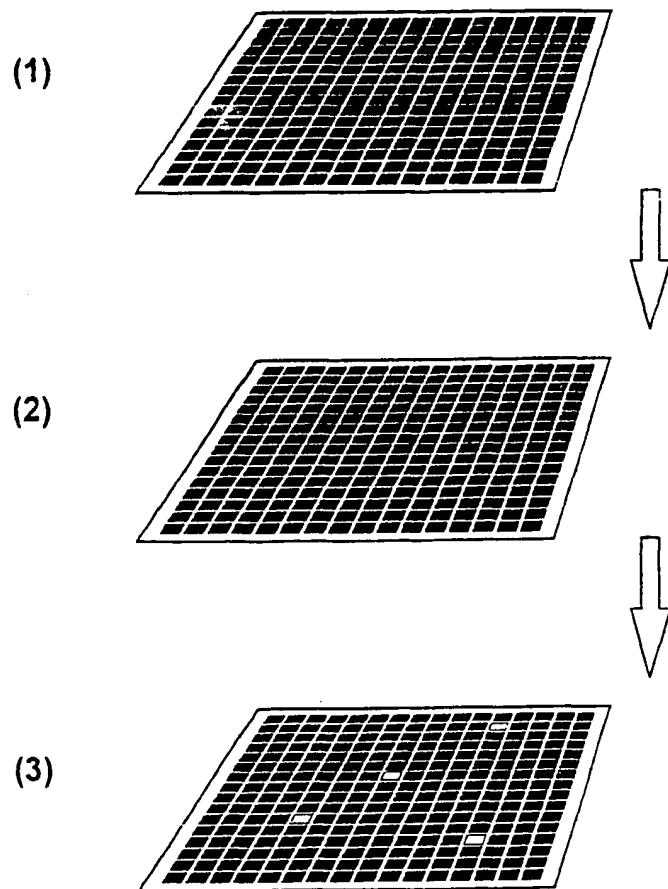


Fig. 11

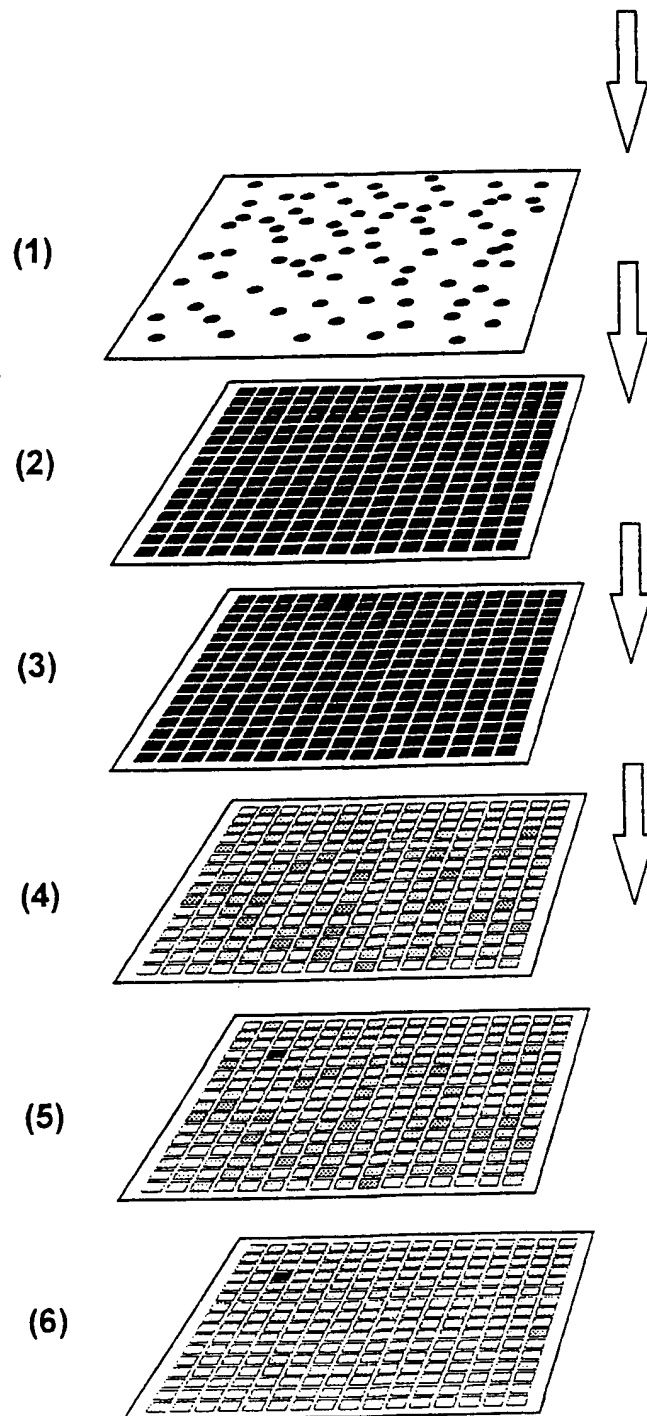


Fig. 12

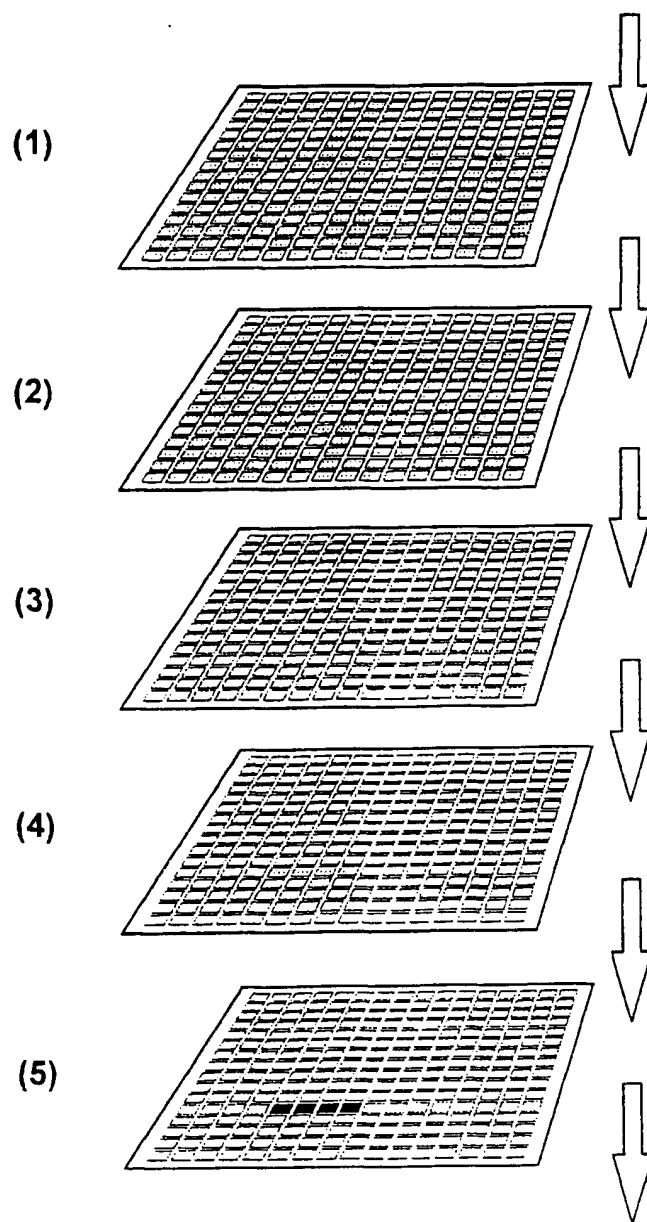


Fig. 13

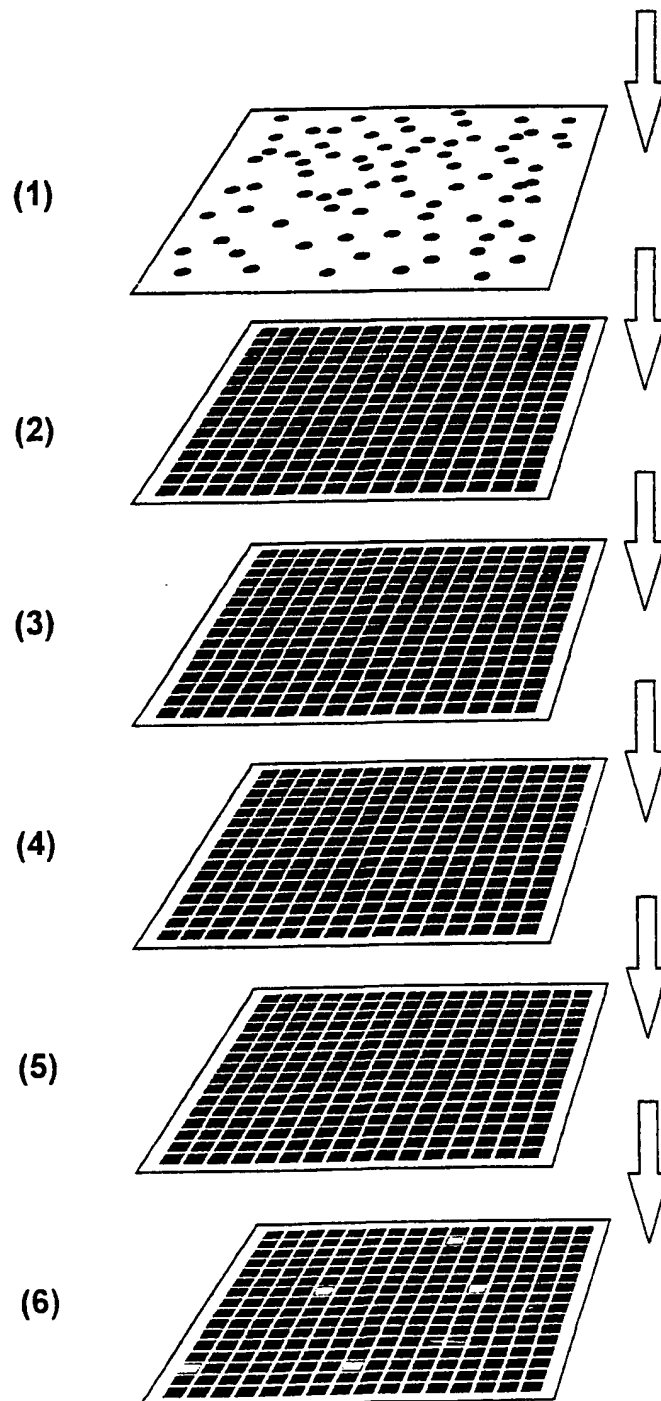
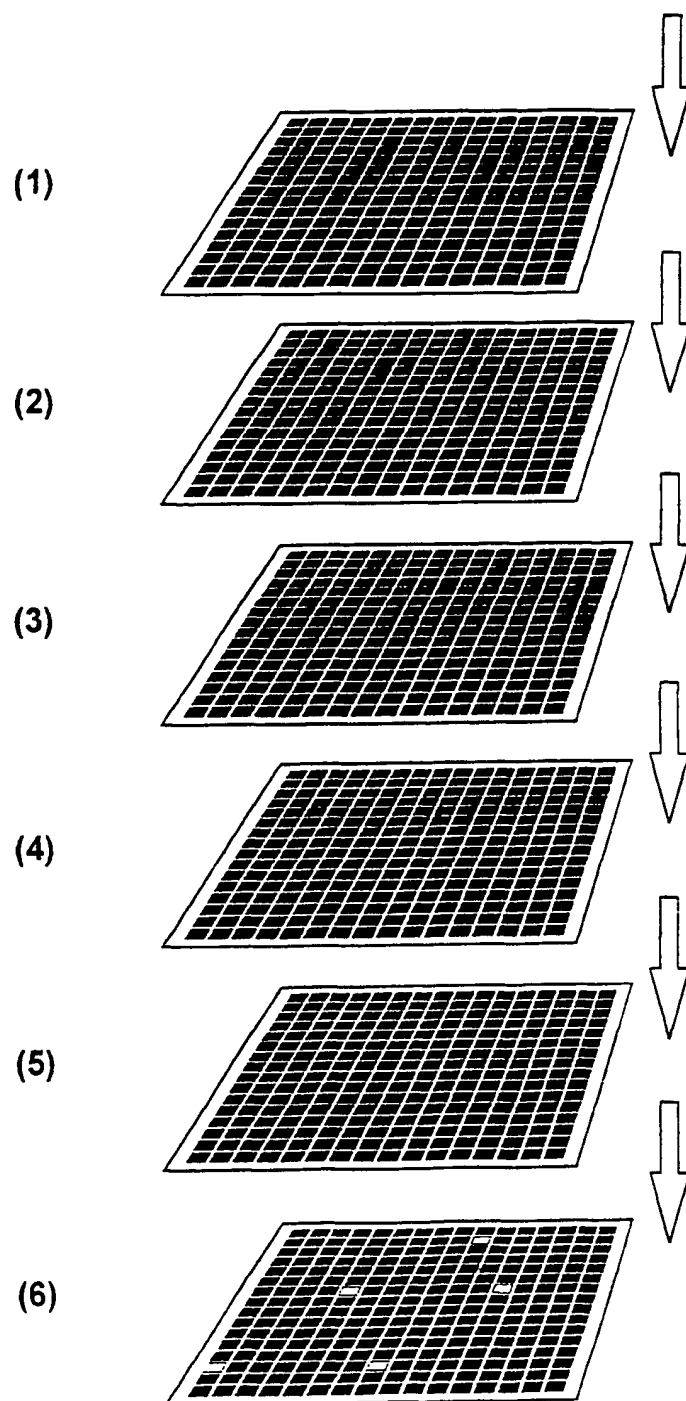


Fig. 14



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

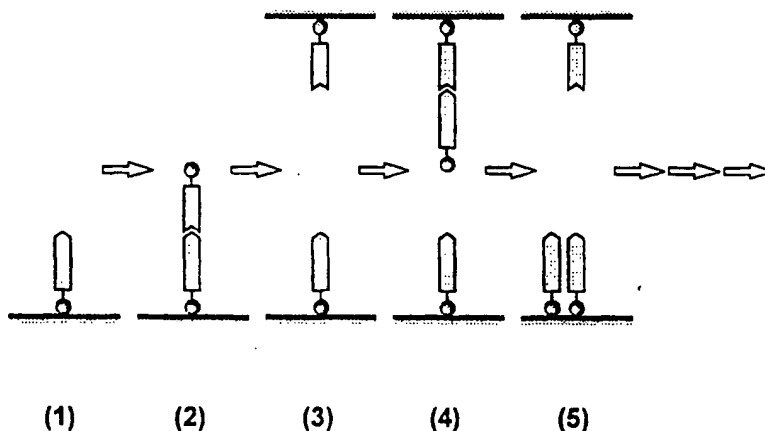
(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12Q 1/68, B01J 19/00		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/32809
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Juni 2000 (08.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03856		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 26. November 1999 (26.11.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 54 946.6 27. November 1998 (27.11.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): NOXXON PHARMA AG [DE/DE]; Gustav-Meyer-Allee 25, D-13355 Berlin (DE).			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: VON KIEDROWSKI, Günter [DE/DE]; Steilstrasse 6c, D-44797 Bochum (DE).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FÜRSTE, Jens, Peter [DE/DE]; Huberweg 14, D-13559 Berlin (DE). KLUSSMANN, Sven [DE/DE]; Paulsbomer Strasse 83 A, D-10709 Berlin (DE). KLEIN, Thomas [DE/DE]; Philipp-Franck-Weg 9, D-14109 Berlin (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 19. Oktober 2000 (19.10.00)	
(74) Anwalt: BOECKH, Tobias; Vinck & Hertin, Uhlandstrasse 173/174, D-10719 Berlin (DE).			

(54) Title: CLONING AND COPYING ON SURFACES

(54) Bezeichnung: KOPIEREN UND KLONIEREN AN OBERFLÄCHEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for cloning and copying genetic material on surfaces as well as copying biological material insofar as it, in a broader sense, can be classified in a ligand receptor system. The invention thus relates, in particular, to a method for propagating ligands and receptors on at least two surfaces which comprises one or several of the following cycles: a) Immobilizing a ligand on a first surface of a solid phase; b) adding a solution of receptors and binding complementary receptors to the ligands; c) transferring the receptor to an additional surface and immobilizing the receptor at that location; d) attaching an additional ligand to the immobilized receptor; e) transferring the ligand to a surface and immobilizing the same at that location. Nucleic acids are also understood as a ligand/receptor system.



(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Klonieren und zum Kopieren genetischen Materials an Oberflächen, aber auch das Kopieren von biologischem Material, soweit es sich in ein Ligand-Rezeptor-System im weiteren Sinne einordnen lässt. Die Erfindung betrifft daher insbesondere ein Verfahren zur Vermehrung von Liganden und Rezeptoren auf wenigstens zwei Oberflächen, umfassend einen oder mehrere der folgenden Zyklen: a) Immobilisierung eines Liganden an einer ersten Oberfläche einer Festphase; b) Zugabe einer Lösung von Rezeptoren und Binden komplementärer Rezeptoren an den Liganden; c) Übertragung des Rezeptors an eine weitere Oberfläche und dortige Immobilisierung des Rezeptors; d) Anlagerung eines weiteren Liganden an den immobilisierten Rezeptor; e) Übertragung des Liganden an eine Oberfläche und dortige Immobilisierung des Liganden. Als Liganden-/Rezeptor-System werden auch Nukleinsäuren verstanden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 99/03856

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 B01J19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LUTHER ET AL.: "SURFACE-PROMOTED REPLICATION AND EXPONENTIAL AMPLIFICATION OF DNA ANALOGUES" NATURE, vol. 396, 19 November 1998 (1998-11-19), pages 245-248, XP002134112	1,2,10, 13,14
Y	the whole document	3-9,11, 12,15-27
Y	US 5 795 714 A (PRZETAKIEWICZ MAREK ET AL) 18 August 1998 (1998-08-18) cited in the application the whole document	1-27
Y	WO 96 01836 A (NANOGEN INC) 25 January 1996 (1996-01-25) the whole document	1-27
	--- -/-- ---	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 June 2000

Date of mailing of the international search report

29/06/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hagenmaier, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No
PCT/DE 99/03856

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 06468 A (RABANI ELY MICHAEL) 20 February 1997 (1997-02-20) the whole document ---	1-27
Y	WO 98 09735 A (DELAMARCHE EMMANUEL ;BIEBUYCK HANS (CH); MICHEL BRUNO (CH); IBM (U) 12 March 1998 (1998-03-12) the whole document ---	1-27
Y	WO 94 29484 A (IMAGEN INC) 22 December 1994 (1994-12-22) the whole document ---	1-27
A	WO 93 17126 A (PUBLIC HEALTH RESEARCH INST OF) 2 September 1993 (1993-09-02) the whole document ---	
A	WO 96 04404 A (MOSAIC TECHNOLOGIES INC ;WHITEHEAD FOR BIOMEDICAL RESEA (US); ADAM) 15 February 1996 (1996-02-15) the whole document ---	
A	EP 0 374 665 A (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC) 27 June 1990 (1990-06-27) the whole document ---	
A	WO 98 14610 A (PERKIN ELMER CORP) 9 April 1998 (1998-04-09) the whole document ---	
A	WO 97 07243 A (IMMUNIVEST CORP) 27 February 1997 (1997-02-27) the whole document ---	
A	WO 98 20019 A (REUTER DIRK ;HIGGINS G SCOTT (DE); LOUGH DAVID M (GB); KOESTER HUB) 14 May 1998 (1998-05-14) the whole document ---	
E	WO 00 27521 A (BALASUBRAMANIAN SHANKAR ;KLENERMAN DAVID (GB); SOLEXA LTD (GB)) 18 May 2000 (2000-05-18) the whole document -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/03856

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5795714	A	18-08-1998	EP 0668932 A	30-08-1995
			JP 8507199 T	06-08-1996
			WO 9411530 A	26-05-1994
			US 6007987 A	28-12-1999
			US 5503980 A	02-04-1996
			US 5631134 A	20-05-1997
WO 9601836	A	25-01-1996	US 6017696 A	25-01-2000
			AU 708677 B	12-08-1999
			AU 2966195 A	09-02-1996
			BR 9506035 A	14-10-1997
			CA 2169852 A	25-01-1996
			CN 1135220 A	06-11-1996
			EP 0717749 A	26-06-1996
			FI 961034 A	02-05-1996
			JP 9503307 T	31-03-1997
			NZ 289731 A	24-09-1998
			US 6068818 A	30-05-2000
			US 5632957 A	27-05-1997
			US 5849486 A	15-12-1998
			US 6048690 A	11-04-2000
			US 6051380 A	18-04-2000
WO 9706468	A	20-02-1997	AU 6752496 A	05-03-1997
WO 9809735	A	12-03-1998	EP 0865323 A	23-09-1998
			JP 10513404 T	22-12-1998
WO 9429484	A	22-12-1994	AT 165118 T	15-05-1998
			AU 690124 B	23-04-1998
			AU 7106794 A	03-01-1995
			CA 2164706 A	22-12-1994
			DE 69409646 D	20-05-1998
			DE 69409646 T	06-08-1998
			DK 702728 T	02-06-1998
			EP 0702728 A	27-03-1996
			ES 2114692 T	01-06-1998
			GR 3026678 T	31-07-1998
			JP 8511425 T	03-12-1996
			US 5545540 A	13-08-1996
WO 9317126	A	02-09-1993	AU 3728093 A	13-09-1993
			CA 2130562 A	02-09-1993
			EP 0675966 A	11-10-1995
WO 9604404	A	15-02-1996	US 5641658 A	24-06-1997
			CA 2196604 A	15-02-1996
			EP 0784701 A	23-07-1997
			JP 10505492 T	02-06-1998
			US 6060288 A	09-05-2000
EP 0374665	A	27-06-1990	AU 3716293 A	01-07-1993
			AU 4714489 A	28-06-1990
			CA 2004326 A	23-06-1990
			DK 662789 A	24-06-1990
			JP 3043099 A	25-02-1991
			PT 92564 A	29-06-1990

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/03856

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9814610 A	09-04-1998	AU 4741797 A EP 0929693 A	24-04-1998 21-07-1999
WO 9707243 A	27-02-1997	US 5660990 A	26-08-1997
WO 9820019 A	14-05-1998	US 5900481 A US 6024925 A AU 5106998 A AU 5247298 A DE 19782095 T DE 19782097 T EP 0954612 A EP 0937097 A NO 992167 A NO 992168 A WO 9820166 A AU 5198098 A DE 19782096 T EP 0937096 A NO 992169 A WO 9820020 A	04-05-1999 15-02-2000 29-05-1998 29-05-1998 23-03-2000 14-10-1999 10-11-1999 25-08-1999 05-07-1999 06-07-1999 14-05-1998 29-05-1998 23-03-2000 25-08-1999 06-07-1999 14-05-1998
WO 0027521 A	18-05-2000	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter nationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03856

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68 B01J19/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q B01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LUTHER ET AL.: "SURFACE-PROMOTED REPLICATION AND EXPONENTIAL AMPLIFICATION OF DNA ANALOGUES" NATURE, Bd. 396, 19. November 1998 (1998-11-19), Seiten 245-248, XP002134112	1, 2, 10, 13, 14
Y	das ganze Dokument	3-9, 11, 12, 15-27
Y	US 5 795 714 A (PRZETAKIEWICZ MAREK ET AL) 18. August 1998 (1998-08-18) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-27
Y	WO 96 01836 A (NANOGEN INC) 25. Januar 1996 (1996-01-25) das ganze Dokument	1-27

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Juni 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/06/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patendaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hagenmaier, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter males Aktenzeichen
PCT/DE 99/03856

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 97 06468 A (RABANI ELY MICHAEL) 20. Februar 1997 (1997-02-20) das ganze Dokument ---	1-27
Y	WO 98 09735 A (DELAMARCHE EMMANUEL ;BIEBUYCK HANS (CH); MICHEL BRUNO (CH); IBM (U) 12. März 1998 (1998-03-12) das ganze Dokument ---	1-27
Y	WO 94 29484 A (IMAGEN INC) 22. Dezember 1994 (1994-12-22) das ganze Dokument ---	1-27
A	WO 93 17126 A (PUBLIC HEALTH RESEARCH INST OF) 2. September 1993 (1993-09-02) das ganze Dokument ---	
A	WO 96 04404 A (MOSAIC TECHNOLOGIES INC ;WHITEHEAD FOR BIOMEDICAL RESEA (US); ADAM) 15. Februar 1996 (1996-02-15) das ganze Dokument ---	
A	EP 0 374 665 A (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC) 27. Juni 1990 (1990-06-27) das ganze Dokument ---	
A	WO 98 14610 A (PERKIN ELMER CORP) 9. April 1998 (1998-04-09) das ganze Dokument ---	
A	WO 97 07243 A (IMMUNIVEST CORP) 27. Februar 1997 (1997-02-27) das ganze Dokument ---	
A	WO 98 20019 A (REUTER DIRK ;HIGGINS G SCOTT (DE); LOUGH DAVID M (GB); KOESTER HUB) 14. Mai 1998 (1998-05-14) das ganze Dokument ---	
E	WO 00 27521 A (BALASUBRAMANIAN SHANKAR ;KLENERMAN DAVID (GB); SOLEXA LTD (GB)) 18. Mai 2000 (2000-05-18) das ganze Dokument -----	1-27

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03856

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5795714 A	18-08-1998	EP 0668932 A	30-08-1995
		JP 8507199 T	06-08-1996
		WO 9411530 A	26-05-1994
		US 6007987 A	28-12-1999
		US 5503980 A	02-04-1996
		US 5631134 A	20-05-1997
WO 9601836 A	25-01-1996	US 6017696 A	25-01-2000
		AU 708677 B	12-08-1999
		AU 2966195 A	09-02-1996
		BR 9506035 A	14-10-1997
		CA 2169852 A	25-01-1996
		CN 1135220 A	06-11-1996
		EP 0717749 A	26-06-1996
		FI 961034 A	02-05-1996
		JP 9503307 T	31-03-1997
		NZ 289731 A	24-09-1998
		US 6068818 A	30-05-2000
		US 5632957 A	27-05-1997
		US 5849486 A	15-12-1998
		US 6048690 A	11-04-2000
		US 6051380 A	18-04-2000
WO 9706468 A	20-02-1997	AU 6752496 A	05-03-1997
WO 9809735 A	12-03-1998	EP 0865323 A	23-09-1998
		JP 10513404 T	22-12-1998
WO 9429484 A	22-12-1994	AT 165118 T	15-05-1998
		AU 690124 B	23-04-1998
		AU 7106794 A	03-01-1995
		CA 2164706 A	22-12-1994
		DE 69409646 D	20-05-1998
		DE 69409646 T	06-08-1998
		DK 702728 T	02-06-1998
		EP 0702728 A	27-03-1996
		ES 2114692 T	01-06-1998
		GR 3026678 T	31-07-1998
		JP 8511425 T	03-12-1996
		US 5545540 A	13-08-1996
WO 9317126 A	02-09-1993	AU 3728093 A	13-09-1993
		CA 2130562 A	02-09-1993
		EP 0675966 A	11-10-1995
WO 9604404 A	15-02-1996	US 5641658 A	24-06-1997
		CA 2196604 A	15-02-1996
		EP 0784701 A	23-07-1997
		JP 10505492 T	02-06-1998
		US 6060288 A	09-05-2000
EP 0374665 A	27-06-1990	AU 3716293 A	01-07-1993
		AU 4714489 A	28-06-1990
		CA 2004326 A	23-06-1990
		DK 662789 A	24-06-1990
		JP 3043099 A	25-02-1991
		PT 92564 A	29-06-1990

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung..., die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03856

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9814610 A	09-04-1998	AU 4741797 A EP 0929693 A	24-04-1998 21-07-1999
WO 9707243 A	27-02-1997	US 5660990 A	26-08-1997
WO 9820019 A	14-05-1998	US 5900481 A US 6024925 A AU 5106998 A AU 5247298 A DE 19782095 T DE 19782097 T EP 0954612 A EP 0937097 A NO 992167 A NO 992168 A WO 9820166 A AU 5198098 A DE 19782096 T EP 0937096 A NO 992169 A WO 9820020 A	04-05-1999 15-02-2000 29-05-1998 29-05-1998 23-03-2000 14-10-1999 10-11-1999 25-08-1999 05-07-1999 06-07-1999 14-05-1998 29-05-1998 23-03-2000 25-08-1999 06-07-1999 14-05-1998
WO 0027521 A	18-05-2000	KEINE	